Detaillierte Kristallstruktur des Enzyms Proteinase K bei hoher Auflösung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christian Betzel
aus Bochum

Berlin 1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549614_0032

Detaillierte Kristallstruktur des Enzyms Proteinase K bei hoher Auflösung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt
von

Christian Betzel
aus Bochum

Berlin 1986

1. Referent : Prof. Dr. W. Saenger

2. Referent : Prof. Dr. H. Hartl

Tag der mündlichen Prüfung : 24. 11. 1986

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1983 bis Juni 1986 am Institut für Kristallographie der Freien Universität Berlin unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Saenger ausgeführt. Sie wurde durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie finanziert.

Meinem Betreuer und Lehrer Prof. Dr. W. Saenger danke ich für die Überlassung des Themas und sein förderndes Interesse.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die sich um eine kreative und harmonische Arbeitsatmosphäre bemüht haben, gebührt Dank. Für technische Hilfe und geduldige Diskussionsbereitschaft möchte ich mich an dieser Stelle besonders bei den Herren R. Hilgenfeld, G.P. Pal, M. Steifa und K. Wichmann bedanken.

Schließlich danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung, die die Durchführung dieser Arbeit doch sehr erleichtert hat.

Inhaltsverzeichnis

1. EINFÜHRUNG 1

1.1 Aufgabenstellung 4

2. METHODEN DER FILMDATENSAMMLUNG.....6

2.1 Überblick 6

2.2 Filmdatensammlung mit der Arndt-Wonacott Kamera 7

2.2.1 Die Arndt-Wonacott Kamera 7

2.2.2 Monochromatische Strahlung 9

2.2.3 Prinzip der Datensammlung 10

2.3 Die Filmauswertung 13

2.3.1 Filmcharakteristik 13

2.3.2 Densitometrie 15

2.3.3 Bestimmung der Reflexintensitäten 17

2.3.3.1 Strahlenschädigung 22

3. SYNCHROTRONSTRAHLUNG 24

3.1 Einleitung 24

3.2 Eigenschaften der Synchrotronstrahlung und Anwendungen in der Proteinkristallographie 26

3.2.1 Nutzung des Wellenlängenspektrums 26

3.2.1.1 Anomale Dispersion 27

3.2.1.2 Die Laue-Methode 29

3.2.2 Intensität der Synchrotronstrahlung 30

3.2.2.1 Bestrahlungszeit 31

3.2.2.2 Tieftemperaturmessungen 31

3.2.2.3 Strahlenschädigung 32

3.2.3 Polarisation 32

3.2.4 Zeitstruktur der Synchrotronstrahlung 33
3.2.4.1 Zeitauflösende Techniken 33
3.2.4.2 Thermodynamisch Diffuse Streuung 34
3.3 Meßstände für die Proteinkristallographie am Speicherring DORIS 35

4. RÖNTGENSTRUKTURANALYSE UND VERFEINERUNG VON PROTEINSTRUKTUREN 37
4.1 Das Phasenproblem in der Proteinkristallographie 37
4.2 Verfeinerung einer Proteinstruktur 39
4.2.1 Verfeinerung nach der Restrained Least-Squares Methode .41

5. DATENSAMMLUNG FÜR DAS ENZYM PROTEINASE K.....46
5.1 Kristallisation des nativen Enzyms zur Datensammlung 47
5.2 Datensammlung bis 2.2 Å mit dem Drehanoden-Generator.....49
5.2.1 Filmauswertung 51
5.3 Datensammlung mit Synchrotronstrahlung 55
5.3.1 Datensammlung bis 1.1 Å 55
5.3.2 Datensammlung bis 1.5 Å 55
5.3.2.1 Filmauswertung 57

6. MODELLBAU UND VERFEINERUNG 61
6.1 Modellbau 61
6.2 Verfeinerung 65
6.2.1 Gang der Verfeinerung 67
6.2.2. Güte der Verfeinerung 72

7. BESCHREIBUNG DER MOLEKÜLSTRUKTUR DER PROTEINASE K.....80
7.1 Allgemeiner Aufbau 80
7.1.1 Konformationswinkel der Hauptkette 84

7.1.2 Temperaturfaktoren 86
7.2 Beschreibung der Sekundärstruktur 88
7.2.1 Die α-Helices 89
7.2.2 Faltblätter und β-Biegungen.....93
7.3 Wasserstoffbrücken der Seitengruppen 95
7.4 Lösungsmittel und Zwischenmolekulare Kontakte 96
7.5 Das aktive Zentrum 99
7.5.1 Katalyse-Mechanismus der Serin-Proteasen 99
7.5.2 Geometrie des aktiven Zentrums von Proteinase K 101
7.5.3 Vergleich mit aktiven Zentren anderer Proteasen 104
7.5.4 Die freie SH-Gruppe im aktiven Zentrum der Proteinase K 106

8. STRUKTURVERGLEICH VON PROTEINASE K MIT SUBTILISIN BPN 110
8.1 Vergleich der Sequenz 111
8.2 Vergleich der räumlichen Struktur 112

9. INHIBITORSTUDIEN 118
9.1 Einleitung 118
9.2 Kristallisation von Proteinase K im Komplex mit einem synthetischen Inhibitor 119

9.3 Datensammlung und Auswertung 120
9.4 Interpretation und Verfeinerung 122
9.5 Kristallisation des bifunktionalen Proteinase/Amylase Inhibitors PKI-3 aus Weizenkeimen und seines Komplexes mit Proteinase K 128

10. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 131

11. ANHANG 134
11.1 Nomenklatur der Aminosäuren 134
11.2 Literaturverzeichnis 135
11.3 Tabellen 143

1. Einführung

Proteine werden oft als Werkstoff des Lebens bezeichnet. Sie spielen in praktisch allen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle und übernehmen die verschiedensten Funktionen[1,2]. Die wahrscheinlich bedeutensten Proteine sind die Enzyme, die als Biokatalysatoren die Geschwindigkeit biologischer Reaktionen bestimmen und beschleunigen, indem sie die Energieschwelle zum Ablauf der Reaktion senken und dabei Reaktionen selbst bei Körpertemperatur ermöglichen [3,4]. Bis heute sind ca. 2000 Enzyme (E), die sich je nach Vorkommen und Funktion in verschiedene Klassen aufteilen lassen, chemisch identifiziert worden. Sie haben neben vielen anderen Eigenschaften die Fähigkeit ein Molekül, für das sie spezifisch sind, das sogenannte Substrat S, zu erkennen und chemisch umzusetzen. Das Substrat wird dabei zuerst an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden (ES) und nach der chemischen Reaktion werden dann die Produkte P_1, P_2 abgegeben.

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P_1 + P_2 \qquad (1)$$

Für das Verständnis der Reaktionsmechanismen ist neben der Kenntnis der Aminosäurezusammensetzung im und um das aktive Zentrum die räumliche Anordnung der funktionellen Gruppen von entscheidender Bedeutung.

Die Proteinkristallographie ist bis heute die einzige experimentelle Technik, mit der die Untersuchung und Bestimmung der räumlichen Anordnung der Atome in einem Molekül ausgeführt werden kann. Eine vollständige Strukturanalyse ist jedoch ein relativ langwieriges Unterfangen, so daß erst ca. 250 Proteine studiert wurden. Trotzdem haben sich gerade aus den Ergebnissen dieser Strukturuntersuchungen detaillierte und konkrete Vorstellungen über den Ablauf biochemischer Reaktionen ergeben.

UNIV. LEIPZIG BIBL.

Die bei einer Röntgenstrukturanalyse zuerst bei niedriger Auflösung berechnete Elektronendichteverteilung liefert meistens nur Information über den Verlauf und die Faltung der Polypeptidkette, sowie angenäherte Aussagen über die Anordnung der Seitengruppen. Um jedoch die gerade für die Erklärung enzymatischer Reaktionen erforderliche möglichst genaue Anordnung der beteiligten Aminosäuren zu erhalten, muß nach Lösung der Struktur anschließend eine Verfeinerung bis zu möglichst hoher Auflösung ausgeführt werden. Eine solche Hochauflösungsstrukturanalyse ist mindestens genau so zeitintensiv wie die vorangehende Strukturaufklärung. Durch die Messung und Verarbeitung vergleichsweise sehr großer Datenmengen werden solche Arbeiten zu einem langwierigen Prozess. Ist eine Verfeinerung erfolgreich ausgeführt worden, können aus den dann ermittelten Atomlagen des Proteins und des zumindest teilweise lokalisierten Lösungswassers genaue Aussagen über die Wechselwirkungen im aktiven Zentrum gemacht werden. Ergänzend zu den meistens schon vorher ausgeführten biochemischen Untersuchungen können auch detallierte Erklärungen und Interpretationen über die Spezifität des untersuchten Proteins gemacht werden.

Die Vorlage einer gut verfeinerten Struktur ist außerdem die Voraussetzung für nachfolgende kristallographische Substrat- bzw. Inhibitor-Studien, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit ausgeführt und bereits veröffentlicht wurden [66,140]. Solche Untersuchungen liefern Information über die spezifische Erkennung des Substrats durch das Enzym und die dreidimensionale Struktur von Zwischenzuständen, wie sie entlang des Reaktionsweges enzymatischer Reaktionen gebildet werden, und bilden damit einen weiteren Beitrag zum Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehung. Dem Biochemiker geben sie die Möglichkeit, gezielt die Spezifität eines Enzyms

durch Austausch bestimmter Aminosäuren zu verändern oder auch durch die Synthese eines dem Emzym angepaßten Inhibitors dieses in seiner möglicherweise ungewünschten Aktivität zu hemmen.

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Enzym, Proteinase K, ist eine der Subtilisin-Familie zugehörende Serin-Protease. Die Serin-Proteasen, die als Wirkgruppe ein Serin im aktiven Zentrum besitzen, spalten Peptid-und Esterbindungen. Sie lassen sich nach heutigem Wissen in zwei nicht verwandte Familien, die Trypsin- und die Subtilisin-Familie, aufteilen.

Die Subtilisine, wie auch die Trypsine, besitzen die für die Katalyse notwendigen Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure in nahezu der gleichen geometrischen Anordnung. Sie stellen damit ein eindrucksvolles Beispiel für die konvergente Evolution einer Katalysewirkung bei zwei völlig verschiedenen Enzymklassen dar [71]. Der Schwerpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen lag jahrelang auf den hauptsächlich in Säugetierorganismen vorkommenden Enzymen der Trypsin-Familie, für die auch eine Reihe von Röntgenstrukturuntersuchungen ausgeführt wurden.

Obwohl die von Bacillus subtilis und verwandten Arten gebildeten Subtilisine aufgrund ihrer industriellen Anwendung heute zu den am meisten produzierten Enzymen gehören [72], wurden sie bisher wissenschaftlich ziemlich vernachläßigt. Erst in den letzten 1-2 Jahren zeigt sich anhand der steigenden Zahl von Veröffentlichungen über Subtilisine ein wachsendes Interesse an diesen Enzymen, welches durch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit sicherlich noch verstärkt wird.

1.1 Aufgabenstellung

Proteinase K wird aus dem Pilz Tritirachium album limber isoliert und gehört zu den aktivsten Endopeptidasen. Die Fähigkeit des Enzyms, Keratin zu spalten, gab ihm den Buchstaben K als Bezeichnung [73]. Ursprünglich von der Fa. MERCK (Darmstadt) zur Verwendung in Haarentfernungsmitteln vorgesehen [78], zeigten sich bald andere, vor allem biochemisch interessante Eigenschaften. Durch die selbst in Gegenwart von Natrium-Dodecylsulfat verbleibende hohe proteolytische Aktivität gegenüber nativen und denaturierten Proteinen findet die Proteinase K heute die häufigste Anwendung bei der Isolation nativer DNA und RNA [79].
Das durch Gelfiltration ursprünglich ermittelte Molekulargewicht von 18000 Dalton [73] und die bis vor kurzem bestehende Unkenntnis über die Sequenz des Enzyms erlaubten keine Zuweisung des Enzyms zur Trypsin- oder Subtilisin-Familie. Um eine eindeutige Zuordung der Proteinase K in eine der beiden Familien zu ermöglichen und außerdem strukturelle Information über die bisher wenig untersuchten Pilz-Proteasen zu erhalten, wurde eine Röntgenstrukturanalyse in diesem Arbeitskreis ausgeführt [74-77]. Diese Studie zeigte die Faltung der Polypeptidkette bei einer Auflösung von 3.3 Å, wobei die nicht direkt meßbaren Phasenwinkel durch mehrfach isomorphen Ersatz bestimmt wurden [75,76]. Die Ergebnisse dieser Arbeit waren zuerst ziemlich überraschend, da sich eine hohe räumliche Strukturhomologie zum Subtilisin BPN zeigte und sich damit das vorher ermittelte Molekulargewicht als falsch erwies. In einer vorläufigen Interpretation der Elektronendichte konnten 266 C_α Positionen bestimmte werden. Anhand dieser Ergebnisse errechnet sich ein Molekulargewicht von ca. 27000 Dalton, welches um ca. 50% höher als das bis dahin ermittelte lag.

Um mehr Information über die Struktur und Aspekte der Evolution der Proteinase K zu erhalten, sollte im Rahmen dieser Arbeit zuerst ein möglichst vollständiges Strukturmodell der 3.3 Å Elektronendichte angepaßt werden. Als nächstes sollte dann, unter Anwendung der Filmmethode zur Datensammlung und Verwendung der hochintensiven Synchrotronstrahlung, eine detaillierte Strukturanalyse und Verfeinerung bis zu möglichst hoher Auflösung ausgeführt werden.

Durch den Neuaufbau der Arbeitsgruppe in Berlin standen zu Beginn dieser Untersuchungen keinerlei funktionsbereite Geräte oder Auswertesysteme zur Verfügung. Diese Arbeit beinhaltet daher den vollständigen Aufbau des Röntgenmeßplatzes zur Datensammlung mit der Filmmethode, sowie die Installation aller zur Datensammlung und Reduktion benötigten Rechnerprogramme.

Da die Filmmethode zum erstenmal erfolgreich in dieser Arbeitsgruppe angewandt wurde, sollen die wesentlichen Grundlagen und die für die Proteinkristallographie interessanten Eigenschaften der Synchrotronstrahlung in den ersten Abschnitten dieser Arbeit zusammengefaßt werden.

Gegen Ende der Hochauflösungsstrukturanalyse ergab sich unter Verwendung eines synthetisch hergestellten Inhibitors für Proteinase K die Gelegenheit zu einer kristallographischen Inhibitor-Studie, deren Durchführung und Ergebnisse ebenfalls beschrieben werden.

2. Methoden der Filmdatensammlung

2.1 Überblick

Die Messung von Röntgenbeugungsintensitäten kann abhängig davon, ob man einen Punkt, eine Linie, eine Fläche oder ein Volumenelement des reziproken Raums erfaßt, entsprechend in null-, ein-, zwei oder dreidimensionale Techniken aufgeteilt werden. Die gebräuchlichste Methode für anorganische und organisch-biologische Kristallstrukturen mit Zellkonstanten bis ungefähr 75 Å ist die null-dimensionale mit einem Zählrohr in Verbindung mit einem Vierkreisdiffraktometer. Die Erfassung einer ganzen Linie des reziproken Raums ist grundsätzlich mit einem energieauflösendem Zählrohr und weißer Röntgenstrahlung, wie sie z.B. eine Synchrotronstrahlungsquelle anbietet, möglich, wird aber praktisch noch nicht angewandt.

Die zweidimensionale Datensammlung mit Filmen wurde 1942 durch die Einführung der Präzessionskamera mit Schichtlinienblende durch Bürger[10] die Grundlage der Proteinkristallographie. Die Präzessionskamera wird teilweise noch heute ohne Schichtlinienblende zur Filmdatensammlung herangezogen[11].

Die Anwendung der ersten halbautomatischen Mikrodensitometer zur Bestimmung und Digitalisierung von Reflexintensitäten [12,13] brachte einen weiteren wesentlichen Fortschritt auf dem Gebiet der Datensammlung. Die nachfolgende Entwicklung von rechnergesteuerten Mikrodensitometern [14,15] ermöglichte eine wesentlich schnellere und genauere Auswertung der Filmschwärzung und eröffnete den Weg zur dreidimensionalen Filmdatensammlung. Diese wurde Mitte der 60er Jahre durch die Überlegungen von U.W. Arndt zu einer möglichst effizienten Datensammlung entscheidend gefördert. Arndt kam zu dem Ergebnis, daß die steigende Zahl großer

organischer Kristallstrukturen die Anwendung einer Meßmethode erforderte, die bei minimaler Strahlenbelastung des Kristalls eine maximale Ausbeute an Meßwerten ermöglicht. Von diesem Standpunkt ausgehend, entwickelte er die von ihm selbst als unorthodox bezeichnete Oszillations-Filmmethode [70]. Sie setzte sich nach dem Erscheinen der Arndt-Wonacott-Rotationskamera als gebräuchlichste Methode der Datensammlung in der Proteinkristallographie durch.

Seit nunmehr 10 Jahren werden elektronische Flächenzähler entwickelt, die den photographischen Film als Detektor ersetzen und eine direkte dreidimensionale Erfassung der Reflexintensitäten ermöglichen sollen [17]. Hierbei haben sich bisher zwei unterschiedliche Systeme durchgesetzt: das auf dem Prinzip des 'Multi-Wire' beruhende proportional Zählrohr und der mit Phosphor beschichtete Bildschirm. Beide Verfahren basieren auf einer der Filmauswertung ähnlichen Philosophie und werden seit einiger Zeit kommerziell vertrieben.

2.2 Filmdatensammlung mit der Arndt-Wonacott-Kamera

2.2.1 Die Arndt-Wonacott-Kamera

Die Arndt-Wonacott-Kamera, auch Rotations- oder Oscillations-Kamera genannt, ist ohne Schichtlinienblende für eine möglichst schnelle dreidimensionale Datensammlung entwickelt worden.

Sie wurde nach ihren Konstrukteuren U.W. Arndt und A.J. Wonacott benannt [16] und wird seit 1973 kommerziell von ENRAF NONIUS (Delft, Holland) vertrieben.

Das Prinzip der Rotationskamera ist einfach und beruht im Gegensatz zu anderen Filmmethoden auf nur einer einzigen Bewegung, nämlich

der Rotation des Kristalls um eine Achse. Diese sogenannte Spindelachse liegt hierbei senkrecht zum einfallenden Röntgenstrahl. Durch die Kristalldrehung kommen nacheinander einzelne reziproke Gitterpunkte in Reflexionsstellung. Die entsprechenden Beugungsreflexe werden dann mit einem möglichst empfindlichen Röntgenfilm erfaßt.

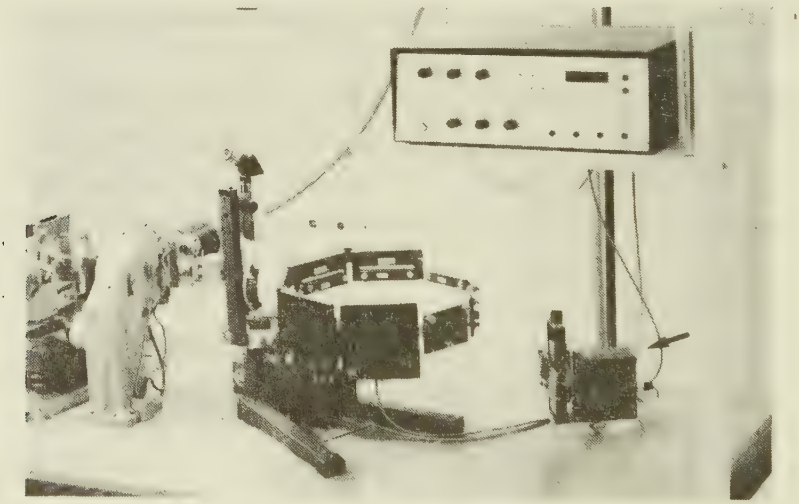


Abb. 2.1 zeigt die A. W. Kamera, wie sie im Rahmen dieser Arbeit aufgebaut wurde, auf einem Drehanodengenerator in Verbindung mit einem Graphit-Monochromator. Der Pfeil in der linken Bildhälfte zeigt auf den Monochromator. Rechts im Bild ist das Zusatzgerät zur Messung der Kristallabsorption zu sehen.

Insgesamt können bis zu acht Filmkassetten auf einer drehbaren Halterung, dem sogenannten Karussell, montiert werden. Das Karussell wird durch einen Computer gesteuert, so daß ein automatischer Filmwechsel möglich ist. Die Filmkassetten haben in drei Ecken auf ihrer Rückseite kleine Löcher. Eine kurze Röntgenbestrahlung mit einem speziellen Kollimator durch diese Löcher produziert außerhalb des zu erwartenden kreisförmigen Diffrak-

tionsbildes von maximal 60 mm Radius punktförmige Filmschwärzungen . Anhand dieser sogenannten 'Fiducial Spots' läßt sich später bei der Filmauswertung die Orientierungsmatrix für den Kristall bestimmen. Neben flachen Filmkassetten werden in manchen Arbeitsgruppen auch zylindrische oder V-förmige Kassetten benutzt, mit denen sich gegenüber flachen Kassetten Reflexe in höheren Auflösungsbereichen sammeln lassen.
Der Kassettenwechsel in Abhängigkeit von Kristallrotation und Bestrahlungszeit wird nach entsprechender Einstellung von einem elektronischen Steuerteil ausgeführt, welches auch das Öffnen und Schließen des Röntgenstrahl-'Shutters' regelt.
Die Filmhalterung selbst ist auf einer optischen Bank befestigt, so daß der Kristall-Film Abstand zwischen 6 und 15 cm variiert werden kann. Diese einfache mechanische Anordnung erlaubt eine hohe Präzision, die der späteren Filmauswertung zu Nutzen kommt.

2.2.2 Monochromatische Strahlung

Monochromatoren sind bei der Filmdatensammlung unbedingt erforderlich [39]. Gegenüber der Ni-gefilterten Strahlung reduzieren sie wesentlich stärker die weiße Untergrundstrahlung, die bei der Filmmethode zu einer störenden Anhebung des Schwärzungsuntergrundes und damit zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis führt.
Die üblicherweise verwendeten Graphit-Monochromatoren verringern außerdem die Bandbreite $\Delta\lambda/\lambda$ der Röntgenstrahlung von 0.4 (für nur Ni-gefilterte Strahlung) auf 0.0025. Dadurch wird ein bedeutend schärferes Reflexprofil und bei großen Zelldimensionen ($\sim$ 100 Å)eine bessere Reflextrennung erreicht. Ein Nachteil des

Graphit-Monochromators ist die Verringerung der Ausgangsintensität um bis zu 30% , welche jedoch bei der Benutzung leistungsfähiger Drehanodengeneratoren nicht so sehr ins Gewicht fällt. Es hat sich außerdem gezeigt, daß bei der Verwendung monochromatischer Röntgenstrahlung Proteinkristalle bis zu zehnmal länger bestrahlt werden können. Als Erklärung wird angenommen, daß sich, der Energie der Wellenlänge entsprechend, bei monochromatischer Strahlung nur die für die Strahlenschädigung verantwortlichen Radikale einer Energiestufe bilden. Bei gefilterter Strahlung bilden sich durch den Restanteil an weißer Untergrundstrahlung Radikale in einem breiteren Energiebereich, die dann eine stärkere und schließlich auch schnellere Strahlenschädigung verursachen können.

2.2.3 Prinzip der Datensammlung

Zu Beginn jeder Datensammlung ist es erforderlich, mindenstens 2 Stillaufnahmen in 90° unterschiedlichen Spindelpositionen aufzunehmen. Aus diesen Aufnahmen wird dann durch Indizierung der Reflexe die genaue Kristallorientierung bestimmt. Stillaufnahmen sollten auch während der Messung in regelmäßigen Abständen wiederholt werden, um eine Nachbestimmung der Orientierung zu ermöglichen, falls der Kristall während der Messung etwas rutschen sollte.

Um einen vollständigen dreidimensionalen Datensatz zu erhalten, wird dann eine fortlaufende Serie von Rotationsaufnahmen erstellt. Der Drehwinkel für eine Rotationsaufnahme wird meist zwischen 0.5° und 3.0° festgelegt. Er wird so gewählt, daß sich möglichst keine Reflexe überlagern. Der Drehwinkel hängt von der Größe der Einheitszelle ab und wird möglichst groß gewählt, um die Anzahl der

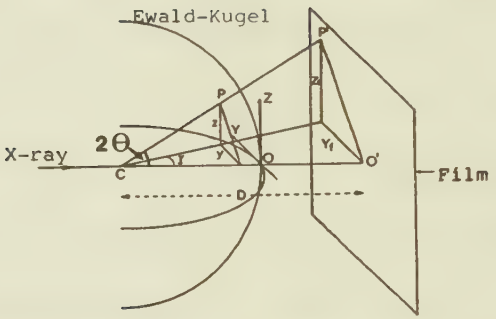
Filme für die Auswertung klein zu halten. Da aber der Hintergrund proportional zur Bestrahlungszeit und damit auch zum Rotationswinkel ist, wird oft ein kleinerer Rotationswinkel gewählt, um einen guten Kontrast zwischen Reflex und Hintergrund zu erzielen.

Der gesamte Rotationsbereich, über den ein Kristall gedreht werden muß, um einen kompletten Datensatz zu erhalten, hängt von der Kristallsymmetrie ab. Für die Proteinase K-Kristalle mit der tetragonalen Raumgruppe $P4_32_12$ genügt eine Drehung von 45° um die vierzählige c-Achse.

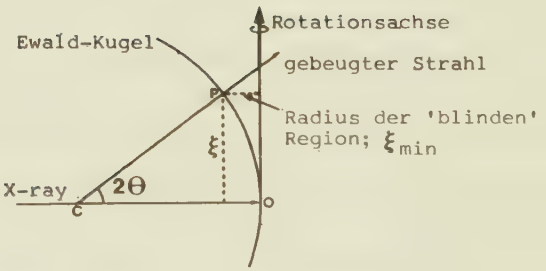
Grundsätzlich erhält man bei der Rotationsmethode auf einem Film zwei Kategorien von Reflexen, die voll- und die partiell Erfaßten. Die Letzteren erscheinen am Anfang oder Ende eines Rotationsbereiches und haben einen weiteren Reflexionsanteil auf dem benachbarten Rotationsfilm. Diese partiellen Reflexionsanteile können jedoch zu einer Gesamtintensität addiert werden und können sogar bei einer notwendigen Orientierungsverfeinerung von Nutzen sein [16]. Die Abbildung 2.2 A zeigt die Zusammmenhänge zwischen dem Filmkoordinatensytem (Y_F und Z_F) und dem Kristallkoordinatensystem (X,Y,Z). Der Punkt P auf der Ewaldkugel liegt gerade in Reflexionsstellung. 2.2 B zeigt, daß bei der senkrechten Anordnung von Röntgenstrahl und Film eine 'blinde Region' existiert, in der keine Reflexe liegen. Die Anzahl dieser nicht beobachteten Reflexe ist klein und beträgt nur ungefähr 3-5% der insgesamt beobachtbaren Reflexe. Dieser Bereich kann jedoch, falls erforderlich, in einer anderen Kristallorientierung nachgemessen werden.

Abb. 2.2

A



B



Ungefähr 50-70 % der einfallenden Reflexintensität werden von einem Röntgenfilm absorbiert. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, den ganzen Intensitätsbereich mit nur einem Film zu erfassen. Man benutzt daher zur Datensammlung 2 bis 3 Filme in einer Filmkassette, sodaß schwache Reflexe auf dem 1. Film und stärkere dann auf den folgenden Filmen in ihrer ganzen Intensität registriert werden können.

2.3 Die Filmauswertung

2.3.1 Filmcharakteristik

Eine Intensitätsbestimmung anhand der Filmschwärzung setzt ein einigermaßen proportionales Verhältnis von einfallenden Röntgenquanten zur dadurch entstehenden Filmschwärzung voraus. Im Gegensatz zum sichtbaren Licht, wo mehrere Photonen benötigt werden, um ein Silberhalogenid in der Filmemulsion zu aktivieren, reicht bei der Röntgenstrahlung ein Quant aus. Die optische Dichte auf dem bestrahltem und entwickeltem Film, allgemein als OD-Wert bezeichnet, ist daher bis zu einem OD-Wert von ungefähr 1.0 proportional zur einfallenden Röntgenintensität. Bei OD-Werten über 1.0 setzt eine Sättigung des Films ein, so daß bei weiterer Bestrahlung eine relativ geringere Schwärzung erzeugt wird. Diese Erscheinung wird auch als Nichtlinearitäts-Effekt bezeichnet. Um die Schwärzung auch in diesem Bereich in die entsprechende Intensität umzuwandeln, müssen Korrekturen angebracht werden, die in erster Linie von der Empfindlichkeit des verwendeten Films abhängen.
Zu diesem Zweck werden experimentelle OD-Kurven in Abhängigkeit zur Bestrahlungszeit erstellt. Aus diesen lassen sich dann die Parameter A und B (siehe Tabelle 2.2 ,Gl. 2) zur Korrektur der Nichtlinearität bestimmen [18].

Tabelle 2.1 Einige Definitionen zur Beschreibung der Filmcharakteristik

Optische Dichte:	Die optische Dichte OD eines belichteten Films wird durch die Messung von I_T/I_0, dem Verhältnis von durchgelassener Intensität I_T einer Lichtquelle zur Ausgangsintensität I_0 gemessen.	
1	$D = \log_{10} I_0 / I_T$, $I_T = I_0 10^{-D}$	

Untergrund : (auch Base OD , oder ´Chemical Fog´) Der Untergrund ist die optische Dichte D eines fixierten, vorher aber nicht belichteten Films. Der Untergrund hängt weitgehend von der Beschaffenheit der Filmemulsion und vom Alter sowie der Lagerung des Films ab. Wünschenswert ist ein möglichst niedriger Untergrund.

Effektive Dichte : Die effektive optische Dichte OD ergibt sich nach Subtraktion des Untergrunds D_u

$$D_{eff} = D - D_u$$

Filmempfindlichkeit (S) : Die Filmempfindlichkeit S entspricht der reziproken Anzahl von Photonen, die eine effektive Dichte von 1.0 pro μm^2 erzeugen.

Filmfaktor (F) : F gibt das Verhältnis I_0/I_T von einfallender zu durchgelassener Röntgenstrahlung an.

Die korrigierte optische Dichte OD_C ergibt sich dann aus der gemessenen Dichte OD_M nach:

$$OD_C = -B \ln(1 - OD_M / A)^2$$

Wobei A und B die für einen Film charakteristischen Parameter darstellen.

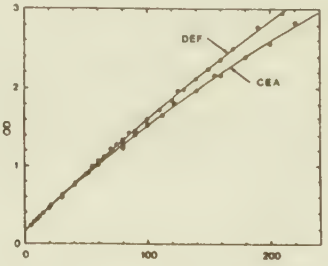


Abb. 2.3 zeigt die optische Dichte in Abhängigkeit zur relativen Bestrahlungszeit für den KODAK DEF-2 und den CEA Reflex-25 Röntgenfilm (19).

Die Eigenschaften und die optimalen Entwicklungsbedingungen für Röntgenfilme, die für kristallographische Arbeiten geeignet sind,

wurden in einigen Arbeiten bestimmt und veröffentlicht [18-21]. Für die in Abschnitt 5. beschriebene Datensammlung standen der KODAK Film DEF-2 und von Cearverken der Film CEA Reflex-25 zur Wahl.

Tabelle. 2.2 zeigt die charakteristischen Eigenschaften dieser beiden Filme

	S	F	BASE OD	A	B
KODAK DEF-2	1.89	3.21	0.10	10.971	10.463
CEA Reflex-25	1.82	2.81	0.04	6.961	6.448

Die Wahl fiel auf den KODAK Film, der für die überwiegend starken Reflexe der gut beugenden Proteinase K - Kristalle bei hohen OD-Werten eine bessere Linearität als der CEA Film zeigt (Abb. 2.3). Bei einer Datensammlung mit mäßig bis schwach beugenden Kristallen sollte man jedoch auf jeden Fall den CEA Film vorziehen, da dieser sich hauptsächlich durch einen niedrigeren Untergrund auszeichnet, der für schwache Reflexe zu einem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis führt.

2.3.2 Densitometrie

Bei der Filmmethode muß die Filmschwärzung (optische Dichte) der Reflexe in digitale Werte übersetzt werden. Hierzu benutzt man photoelektrische Densitometer. Sie arbeiten nach dem Prinzip des Photometers, bei dem die durch die Filmschicht gehende Intensität mit der auffallenden verglichen und der Unterschied im logarithmischen Maßstab angegeben wird. Geräte, welche die optische Dichte in möglichst kleinen Rastern bestimmen können ('scannen'), heißen Mikrodensitometer [22-24]. Das in der Proteinkristallographie am häufigsten benutzte Gerät ist das von der Firma

OPTRONICS (Chelmsford,England) hergestellte rechnergesteurte Trommeldensitometer mit der Bezeichnung P1000 . Es wandelt die optische Dichte im Bereich von 0-2 oder 0-3 OD entsprechend dem 8 Bit-Format des Rechners in natürliche Zahlenwerte von 0 bis zu maximal 255 ($2^8-1 = 255$) um.

Der Film wird dabei über einen Aussschnitt einer zylindrischen, drehbaren Trommel befestigt und von einer fokussierten Lichtquelle im 25, 50 oder 100 µm Raster durchleuchtet. Die durchgelassene Lichtintensität wird während der Trommeldrehung ebenfalls im 25,50 oder 100 μm Raster von einer Photozelle gemessen. Nach jeder Drehung werden dann Lichtquelle und Photozelle dem Raster entsprechend in Richtung der Drehachse bewegt. Die Meßwerte für jedes Raster werden über den angeschlossenen Rechner zur Weiterverarbeitung auf einer größeren Rechenanlage auf Magnetband geschrieben. Für die Güte der Auswertung ist eine genaue mechanische Justierung der Lichtquelle und der Photozelle sowie eine genaue Einstellung des logarithmischen Verstärkers wesentlich. Am Standort des Gerätes sollte außerdem eine möglichst konstante Raumtemperatur vorhanden sein, da sich die Arbeitsbereiche der elektronischen Bauteile bei Temperaturschwankungen leicht verschieben. Die Justierung des Densitometers wurde aus diesen Gründen vor jeder Messung mit äußerster Sorgfalt ausgeführt. Hierbei wurde der Verstärker der Photozelle so abgeglichen, daß er einen Wert von 0.0 für den ungehinderten Lichtstrahl ausgab, Mit geeichten KODAK-Filtern wurde dann die Ausgabe für OD-Werte von 1.0, 2.0 und 3.0 einjustiert. Anhand eines Graukeils, der sich aus einer Folge von ca. 20 verschiedenen genormten Schwärzungsstufen zusammensetzt, wurde danach die Linearität des logarithmischen Verstärkers überprüft. Die mechanische und elektronische

Stabilität des ganzen Systems wurde durch wiederholte Messungen der gleichen Schwärzungsstufe ermittelt. Die Abweichungen vom Mittelwert lagen dabei im akzeptablen Bereich von 3-4%, der auch ähnlich an gleichen Geräten bestimmt wurde [24] .

2.3.3 Bestimmung der Reflexintensitäten

Zur Filmauswertung wurden in einigen Arbeitsgruppen unterschiedliche Programmpakete entwickelt. In einer Vergleichsstudie [27,28], bei der ein Filmdatensatz bis zu den Strukturfaktoren reduziert wurde, zeigten sich die Vorteile von Programmsystemen, die anhand der partiellen Reflexe eine Nachverfeinerung der Kristallorientierung und der Zellkonstanten erlauben .Die Notwendigkeit für diese Nachverfeinerungen wurde vor allem bei der Auswertung der Röntgendaten sehr großer Kristallstrukturen deutlich [29,58]. Bei der Auswahl des Programmsystems fiel die Entscheidung auf das MOSCO-System (Measure OSCillation PhOtographs) [30] , welches ursprünglich von A. Wonacott in Cambridge entwickelt wurde. Die einzelnen Schritte und die Bezeichnungen der Unterprogramme dieses Systems sind in Abb. 2.4 schematisch dargestellt. Das System bietet die Möglichkeit der Nachverfeinerung und gewährleistet in Verbindung mit dem zur Zeit der Filmauswertung zur Verfügung stehenden DEC-Rechner VAX 11/750 im interaktiven Betrieb eine sehr effektive Datenauswertung. Bei der Programminstallation wurde Wert auf die graphische Darstellung und Kontrolle verschiedener Auswerteschritte gelegt. Hierzu dient ein Tectronic-kompatibles Grafik-Terminal.
Die Programme wurden sowohl auf eine interaktive Benutzung, die eine Veränderung einzelner Parameter während des Programmlaufs

ermöglicht, als auch auf 'Batch'- Betrieb ausgelegt. Der Programmablauf stellt sich wie folgt dar:

Zuerst wird anhand der Stillaufnahmen die Orientierung des Kristalls errechnet. Hierzu werden von mindestens zwei Stillaufnahmen, die im Rotationswinkel ungefähr 90° auseinanderliegen sollten, die relativen Koordinaten von ca. 20 Reflexen mit einem speziellen Film-Ablesegerät der Firma STOE (Darmstadt) bestimmt. Das Programm IDXREF ermittelt hieraus die Orientierung sowie die genauen Zellparameter und gibt diese Information in Form einer Orientierungsmatrix aus.

Als nächstes wird mit dem Programm GENVEE für einige Rotationsfilme das entsprechende Beugungsmuster, das heißt die erwarteten Lagen der einzelnen Reflexe berechnet. Die Ausgabe des Programms beinhaltet neben den Millerschen Indizes Information über die Lage und ungefähren Abmessungen der Reflexe in Form einer rechteckigen Reflexfläche ('Reflexbox'), über die das Programm MOSFLM dann die Integration ausführt. Hierbei stellt sich dann heraus, ob die Orientierungsmatrix zufriedenstellend bestimmt worden ist. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die Reflexfläche in der interaktiven Benutzung mit dem Grafikgerät optimal der wirklichen Reflexform anzupassen.

Sind einige aufeinanderfolgende Filme mit dem Programm MOSFLM reduziert worden, läßt sich die Orientierungsmatrix mit dem Programm POSTCHECK überprüfen. Dazu wird für partielle Reflexe, die zu bestimmten Anteilen auf benachbarten Filmen vorhanden sind, das errechnete mit dem gemessenen Anteils-Verhältnis verglichen und daraus eine verfeinerte Orientierungsmatrix abgeleitet [37]. Ist diese letzte Kontrolle abgeschlossen, kann für alle Filme die Lage der Reflexe berechnet werden und die anschließende Integration ohne größere Eingriffe ausgeführt werden. Ergeben sich jedoch Anzeichen dafür,

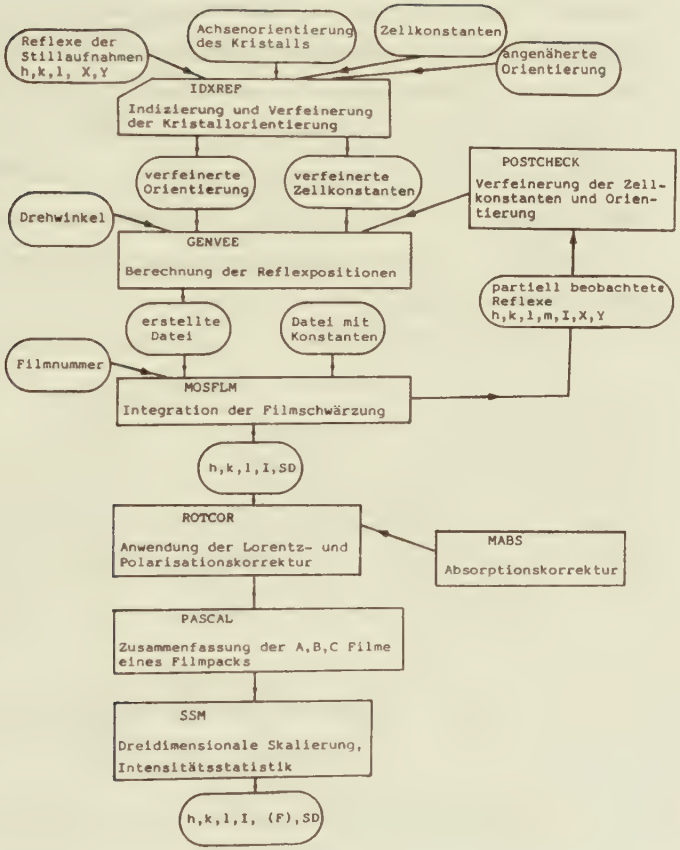


Abb. 2.4 zeigt als Schemazeichnung die einzelnen Stufen und Programmbezeichnungen, sowie die benötigten Eingaben und möglichen Wege des MOSCO Filmauswertesystems.

daß der Kristall während der Messung gerutscht ist, kann die Orientierung mit Stillaufnahmen aus diesem Bereich nachbestimmt werden. Ist die Integration abgeschlossen, werden Lorentz- und Polarisationskorrektur, sowie eine Korrektur für die schräg einfallenden Röntgenstrahlen (´Oblique Incidence´) und, falls erforderlich, eine Absorptionskorrektur angewandt. Der Lorentzfaktor L berücksichtigt, daß die reflektierenden Gitterebenen bei der Drehbewegung verschieden lange in Reflexionsstellung verweilen. Er ergibt sich aus der Geometrie der Arndt-Wonacott Kamera zu :

4 $$L^{-1} = (\sin^2 2\Theta - \xi^2)^{1/2}$$

ξ: siehe Abb. 2.2 B

Der Polarisationsfaktor korrigiert die Polarisierung des Röntgenstrahls, die je nach Reflexionswinkel unterschiedlich stark ist. Für den Graphit-Monochromator mit Monochromatorkristall-Ebene senkrecht zur Rotationsachse ergibt sich nach [31] folgende Korrektur:

5 $$\xi^2 \frac{(1 - \cos 2\Theta_M) + \cos 2\Theta + \cos 2 \Theta_M}{1 + \cos 2\Theta}$$

Θ_M: Bragg´scher Winkel des Monochromator-Kristalls

Für die Synchrotronstrahlung gilt eine spezielle Korrektur (Abschn. 3.2.3) .

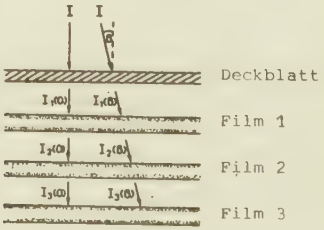


Abb. 2.5

Die Abbildung zeigt die geometrische Grundlage der Korrektur für ´schräg einfallende Strahlung´ für ein aus drei Filmen bestehendes Filmpack. Der einfallende gebeugte Strahl der Intensität I

wird durch Absorption in den einzelnen Filmschichten im senkrechten Fall auf I_0 abgeschwächt und aufgrund der etwas unterschiedlichen Weglänge bei einem Einfallswinkel β auf I_β. Aus Filmdicke und Absorption läßt sich ein entsprechender Korrekturfaktor berechnen [32].

Eine Absorptionskorrektur ist bei der Rotationsmethode nur erforderlich, falls die Form der Kristalle unregelmäßig ist und sich dadurch die Transmissionsstrecke des Röntgenstrahls während der Messung erheblich ändert.

Zur Bestimmung des Transmissionskoeffizienten stehen zwei empirische Methoden zur Verfügung. Bei einem Verfahren wird bei niedriger Röntgenstrahlintensität auf einer Präzessionskamera nach Entfernen des Primärstrahlfängers während der Präcessionsbewegung des Kristalls ein Schwärzungsring produziert. Aus der Variation der Intensität als Funktion der Lage auf dem Ring läßt sich eine Absorptionskurve ableiten [33].

Bei dem anderen Verfahren werden mit einem abgeschwächten Primärstrahl auf einem speziellen Zusatzgerät zur Arndt-Wonacott Kamera (siehe Abb. 2.1) Absorptionsstreifen gemessen. Das Gerät besteht aus einer horizontal beweglichen Kassettenhalterung, deren Antrieb mit der Kristallrotation gekoppelt wird. Einer Kristallrotation von 360° entsprechen dann ein oder mehrere Schwärzungsstreifen. Das Programm MABS (Measurement and Analysis of Absorption Streaks) analysiert diese Streifen und erstellt eine Absorptionskurve, die über das Programm ROTCOR auf die einzelnen Reflexe angewandt wird. Das Programm PASCAL skaliert die Intensitäten der Filme einer Filmkassette untereinander und berechnet für symmetrieäquivalente Reflexe einen R-Faktor. Dieser gibt zusammen mit einer vorläufigen Intensitätsstatistik Information über die Güte der Messung und eine eventuell signifikante Strahlenschädigung, die

sich durch einen Intensitätsabfall in höheren Auflösungsbereichen bemerkbar macht.
Die anschließende dreidimensionale Skalierung wird mit dem Programm SSM nach der Methode von Fox und Holmes [34] durch Berechnung eines Skalenfaktors und eines relativen Temperaturfaktors zwischen den einzelnen Filmen ausgeführt. Danach werden die partiellen Anteile zu vollständigen Reflexen zusammengefaßt sowie die Intensitäten und Standardabweichungen der symmetrieäquivalenten Reflexe gemittelt. Die Ausgabe der mittleren gewichteten Intensitäten schließt die eigentliche Filmauswertung ab.
Verbesserungen der Filmauswertesysteme gehen gerade in letzter Zeit in Richtung einer interaktiven Orientierungsbestimmung, wobei mit Hilfe von Grafik-Geräten das jeweilige Beugungsmuster stufenlos dargestellt werden kann [68].

2.3.3.1 Strahlenschädigung

Die Strahlenschädigung in Proteinkristallen wird durch die Bildung von $^{\cdot}HO$-Radikalen erklärt, die durch den ganzen Kristall diffundieren und das Protein an verschiedensten Stellen zerstören [40].
Eine Korrektur für die Strahlenschädigung wird jedoch, wie die Erfahrung zeigt, nur selten benötigt, da in den meisten Fällen ein bis zwei Tage bis zu einer sichtbaren Strahlenschädigung vergehen und die Datensammlung bis dahin oft schon abgeschlossen ist. Ist außerdem der zu messende Kristall genügend groß bzw. lang, so kann er gegebenenfalls bei Anzeichen für eine Strahlenschädigung entlang der Rotationsachse verschoben werden, so daß dadurch ein neuer, ungeschädigter Teil des Kristalls gemessen werden kann. Durch die Bestimmung eines Skalen- und relativen Temperaturfaktors werden zusätzlich bei der Mittelung symmetrieverwandter Reflexe

Effekte der Strahlenschädigung weitgehend ausgeglichen [35]. Um dennoch den zeitlichen Intensitätsabfall durch Strahlenschädigung abzuschätzen, kann am Ende einer Datensammlung die erste Rotationsaufnahme wiederholt werden. Durch Vergleich der Intensitäten läßt sich dann eine empirische Korrektur ableiten [36].

3. Synchrotronstrahlung

3.1 Einleitung

Die Synchrotronstrahlung wurde zum ersten Mal als Nebenprodukt beim Betrieb von Elektronenkreisbeschleunigern entdeckt [41]. In diesen Maschinen werden aus Elektronen bzw. Positronen bestehende Teilchenbündel ('Bunches') auf nahezu Lichtgeschwindigkeit beschleunigt und durch Ringmagneten auf einer kreisförmigen Bahn gehalten. Sobald diese Teilchenbündel die Kreisbögen des Beschleunigers durchlaufen, unterliegen sie Beschleunigungskräften und verlieren nach den Gesetzen der Elektrodynamik Energie, die sie in Form von Strahlung tangential zu den Kreisbögen abgeben. Da sehr starke Magnetfelder benötigt werden, um die Teilchen auf ihrer Kreisbahn zu halten, kann die Magnetfeldstärke nicht konstant aufrecht erhalten werden. Das Magnetfeld eines einzelen Ringmagneten wird daher so gesteuert, daß es seinen Höchstwert erreicht, wenn ein Teilchenbündel gerade den Magneten durchläuft. Damit erfolgt der Auf- und Abbau des Magnetfeldes synchron zum Teilchenfluß. Dieser Synchronität verdankt der Kreisbeschleuniger und die entstehende Strahlung ihren Namen.

Der Wellenlängenbereich der Synchrotronstrahlung erstreckt sich vom sichtbaren Licht bis zur γ-Strahlung, wobei die Intensität mit der Energie der umlaufenden Teilchen zunimmt.

Anwendung findet die Synchrotronstrahlung in der Festkörper-, Atom- und Biophysik, der Molekularbiologie und in der Röntgenstrukturanalyse [42,43]. Pioniere in der Benutzung der Synchrotronstrahlung waren K.C. Holmes, G. Rosenbaum und J. Witz [44]. Sie führten als erste Röntgenbeugungsversuche an Makromolekülen am DESY in Hamburg aus.

Ein Vergleich der Intensitäten von Synchrotron- zu konventionellen

Röntgenquellen zeigte schon damals die großen Vorteile und Möglichkeiten der Sychrotronstrahlung [45] und förderte den Bau des Hamburger-Synchrotronforschungslabors (HASYLAB) und der EMBL (European Molecular Biology Laboratory)-Meßstation am Speicherring DORIS. Nach Inbetriebnahme des Speicherrings DORIS in Hamburg und DCI in Paris nahm das Interesse an der Synchrotronstrahlung sprunghaft zu. In der Proteinkristallographie wurde die Filmdatensammlung mit Synchrotronstrahlung schon nach kurzer Zeit routinemäßig angewandt und verbreitete sich in den letzten 10 Jahren weltweit auch an anderen Sychrotronstrahlungsquellen, wie Stanford, Daresbury, Cornell.

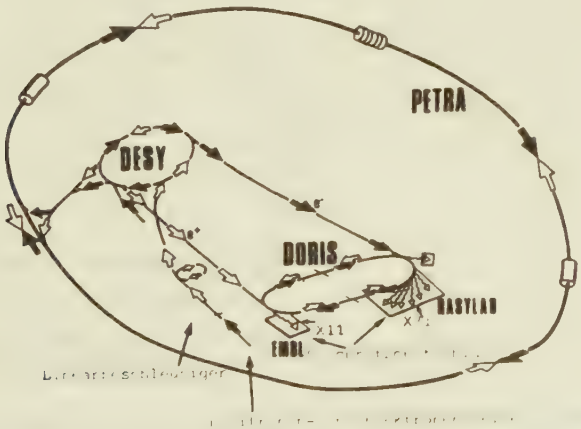


Abb. 3.1 zeigt den Speicherring DORIS in der Gesamtanlage des Deutschen Elektronen-Synchrotrons (DESY). Die aufeinanderzeigenden Pfeile symbolisieren die Meßstände der Hochenergie-Physiker. Durch den Linearbeschleuniger werden Elektronen und Positronen in den Speicherring DESY geleitet, dort vorbeschleunigt und danach in den Doppelspeicherring (DORIS) geleitet. Die geschlängelten Pfeile deuten die tangential austretende Synchrotronstrahlung an.

3.2 Eigenschaften der Synchrotronstrahlung und Anwendungen in der Proteinkristallographie

Von besonderem Interesse für die Proteinkristallographie ist natürlich die hohe Intensität der Synchrotronstrahlung. Daneben läßt sich das breite Wellenlängenband, die natürliche Kollimation und die Zeitstruktur für Beugungsversuche ausnutzen. Die Polarisation der Synchrotronstrahlung hat bisher noch keine direkten Anwendungen in der Kristallographie gefunden.

3.2.1 Nutzung des Wellenlängenspektrums

Das kontenuierliche Röntgenspektrum der Synchrotronstrahlung ermöglicht je nach Problemstellung die Wahl einer geeigneten Wellenlänge.

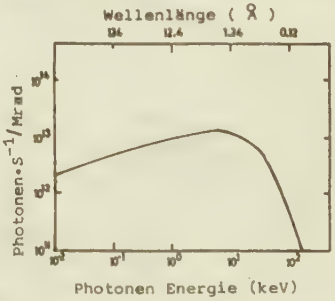


Abb. 3.2 zeigt den zur Verfügung stehenden Wellenlängenbereich und die Intensität der austretenden SR-Strahlung.

Wie man aus Abbildung 3.2 sieht, ist der Speicherring DORIS besonders für Experimente mit Wellenlängen um 1 Å geeignet.
Auf den Meßständen der Proteinkristallographie läßt sich eine Wellenlänge im Bereich von 0.6 Å bis 2.5 Å mit einer typischen Bandbreite von 0.001 ($\Delta\lambda/\lambda$) einstellen.
Um Hochauflösungsdaten zu sammeln, wird meist eine Wellenlänge

kleiner als 1.5 Å gewählt, bei der die Absorption von biologischem Material vernachlässigbar klein wird und damit bei der Datenreduktion nicht berücksichtigt werden muß.
Da das Absorptionsvermögen der Filme bei Wellenlängen unterhalb von 1.5 Å ebenfalls stark abnimmt, werden bei der Filmdatensammlung dünne Stahlfolien zwischen die Filme in einer Filmkassette gelegt, um die Absorption zu erhöhen und dadurch wieder den vollen dynamischen Intensitätsbereich der Beugungsreflexe zu erfassen. Für Datensammlungen im mittleren Auflösungsbereich wird aus diesem Grund eine Wellenlänge um 1.5 Å bevorzugt, bei der auch die Intensität am größten ist (siehe Abb. 3.2) .

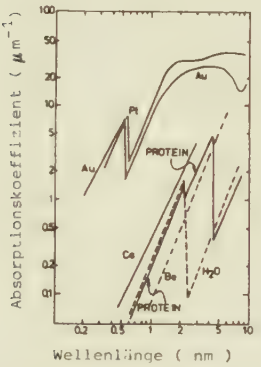


Abb 3.3

zeigt den linearen Absorptionskoeffizienten μ für verschiedenene Materialien. Deutlich ist zu erkennen, daß μ für Proteine bei einer Wellenlänge unter 1 Å vernachlässigbar klein wird.

3.2.1.1 Anomale Dispersion

Ein weiterer Vorteil des energiereichen kontinuierlichen Wellenlängenbereichs liegt in der Ausnutzung der anomalen Dispersion zur Phasenbestimmung. Als anomale Dispersion bezeichnet man das Phänomen des wellenlängenabhängigen Streuvermögens f eines chemischen Elements. f setzt sich wie folgt zusammen:

$$f = f_0 + f' + f'' \qquad (1)$$

Für Wellenlängen, die nicht in der Nähe einer Absorptionskante liegen, ist der anomale Beitrag f' und f'' vernachlässigbar. Bei Wellenlängen nahe einer Absorptionskante kann jedoch ein Röntgenquant absorbiert werden. Dies führt neben der Aussendung eines Photoelektrons zu einer erheblichen Änderung der Phase und der elastischen Streuamplitude der gebeugten Welle. Dieser Effekt wird durch die anomalen Streuamplituden f' und f'' gegenüber der normalen Streuamplitude f_o berücksichtigt. Hierbei führen f' und f'' zur Aufhebung des Friedelschen Gesetzes :

$$I_{(H,K,L)} \neq I_{(-H,-K,-L)} \qquad (2)$$

Der durch die anomale Dispersion verursachte Unterschied zwischen den Intensitäten der beiden Reflexe eines Friedelpaares (H,K,L) und (-H,-K,-L) wird als anomale Differenz bezeichnet. Bijvoet zeigte 1949 als erster, daß sich anhand dieser anomalen Unterschiede die Phasenwinkel der Röntgenreflexe bestimmt werden können [57]. Die Auswertung von Daten mit anomalen Streubeiträgen muß jedoch äußerst sorgfältig ausgeführt werden, da die anomalen Differenzen im Vergleich zu den Intensitäten klein sind und durch ungenaue Absorptionskorrekturen oder Skalierungsfehler leicht verfälscht werden können. Die Anwendung der anomalen Dispersion zur Strukturlösung mit konventioneller Röntgenstrahlung und Synchrotronstrahlung wird in zahlreichen Übersichtsartikeln beschrieben [65,152], so daß an dieser Stelle nicht mehr ausführlich darauf eingegangen werden soll.

Da Absorptionskanten für jedes Element bei verschiedenen Wellenlängen tabelliert vorliegen, kann mit Synchrotronstrahlung durch gezielte Wahl der Wellenlänge die Absorptionskante einer Atomart 'angepeilt' werden. Meist wählt man hierfür sogenannte Schweratome aus, deren Ordungszahl über 45 liegt. Aus der Analyse der Inten-

sitäten der Reflexe HKL und -H,-K,-L lassen sich die Lagen der Schweratome bestimmen, womit dann die Phasen der Beugungsreflexe berechnet werden können. In einem Fall konnte sogar mit Hilfe der anomalen Dispersion von Schwefel, einem natürlich vorkommenden Element in Proteinen, die Kristallstruktur gelöst werden [59].

3.2.1.2 Die Laue-Methode

Neben monochromatischer Synchrotronstrahlung werden in der Proteinkristallographie in jüngster Zeit auch Beugungsexperimente mit polychromatischer Strahlung, das heißt mit weißer Strahlung im Bereich von 0.5 - 2.5 Å durchgeführt [60]. Mit dieser sogenannten Laue-Methode lassen sich Datensätze in sehr kurzer Zeit sammeln. Erste Messungen haben gezeigt, daß bis zu 40000 Reflexe pro Sekunde auf einem Film erfaßt werden können [38].

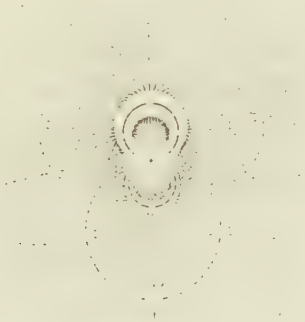


Abb. 3.4 zeigt eine Laue-Aufnahme eines Erbsen-Lectin Proteinkristalls (152).

Bei herkömmlichen Rotationsaufnahmen werden nur ungefähr 3000-5000 Reflexe auf einem Film erfaßt. Die Laue Methode wird daher gerade für die Datensammlung von Zwischenzuständen der Enzym-Substrat-Katalyse, die nur kurzzeitig existieren, interessant. Schwierigkeiten, an denen zur Zeit noch ge-

arbeitet wird, liegen in der Indizierung der Reflexe und der Erkennung sowie Aussortierung von sich überlappenden Reflexen [62]. Neben der Installation von Flächenzählern, die zur Zeit an den meisten Synchrotron-Meßstationen vorrangetrieben wird, ist die Laue Methode für die Proteinkristallographie eine sinnvolle Ergänzung bei der Nutzung der Synchrotronstrahlung.

3.2.2 Intensität der Synchrotronstrahlung

Nach Schwinger [41] läßt sich aus den Betriebsparametern eines Kreisbeschleunigers direkt die Leistung P und die sogenannte kritische Wellenlänge λ_c der Strahlung berechnen, bei der die eine Hälfte der absoluten Leistung oberhalb, die andere unterhalb ausgesendet wird. Es gilt:

$$P \sim \frac{E^4 \times I}{R} \qquad (3)$$

Für einen Kreisausschnitt von θ mrad

$$P_\theta \sim \frac{E^4 \times I}{R}\,\theta$$

$$\lambda_c = 5.59 \cdot R / E^3$$

R: Radius der Krümmungsmagneten in m
(für DORIS 12.2 m)
E: Energie in GeV

I: Teilchenstrom in mA

Die Intensität der Synchrotronstrahlung ist an einem Speicherring in der Größenordnung von DORIS gegenüber einem Drehanodengenerator bei vergleichbarer Wellenlänge ungefähr 200-300 mal stärker. Daher läßt sich für fast alle Proteinkristalle eine erhebliche Steigerung der Auflösung und wesentliche Verkürzung der Meßzeiten

erreichen. Die meisten Anwendungen liegen deshalb bisher in der Hochauflösungsdatensammlung [42].

Daneben lassen sich mit Synchrotronstrahlung Daten von sehr kleinen Kristallen sammeln, oder auch von Kristallen hochmolekularer Substanzen, die aufgrund ihrer großen Zelldimensionen und hohen Lösungsmittelanteile mit herkömmlicher Röntgenstrahlung meist nur schwache Diffraktion zeigen. Beispiele hierfür sind die Datensammlung von Kristallen des Rhinovirus und der 50 S ribosomalen Einheit mit Zellabmessungen von 400 Å [52] bzw. von 900 Å [53].

3.2.2.1 Bestrahlungszeit

Durch die hohe Intensität der Synchrotronstrahlung liegt die Bestrahlungszeit für eine Rotationsaufnahme zwischen wenigen Sekunden für kleine Proteinstrukturen und ungefähr 30 Minuten für große Virusstrukturen. Bei der Datensammlung der Proteinase K bis 1.5 Å wurden für eine Rotationsaufnahme im Durchschnitt nur 8 Minuten Strahlzeit benötigt. Für Proteine in dieser Größenordnung reichen meistens 1-3 Tage bei guten Strahlbedingungen zur Messung eines Hochauflösungsdatensatzes.

3.2.2.2 Tieftemperaturmessungen

Die schnelle Datensammlung bis zu hoher Auflösung ermöglicht in Verbindung mit einer Tieftemperatureinrichtung die Beobachtung von Zwischenzuständen bei der Enzym-Substrat-Katalyse.
Die Lebenszeit eines Zwischenzustandes liegt bei Raumtemperatur im Millisekundenbereich. Durch Abkühlung auf -100° werden jedoch Lebenszeiten von ca. 1 Tag erreicht, so daß in dieser Zeit unter günstigen Bedingungen schon ein kompletter Datensatz gemessen

werden kann. Experimente dieser Art können mit einer Strömungszelle (´Flow Cell´) , durch die dem Kristall während der Messung eine Substratlösung zugegeben wird, ausgeführt werden [49,50] .

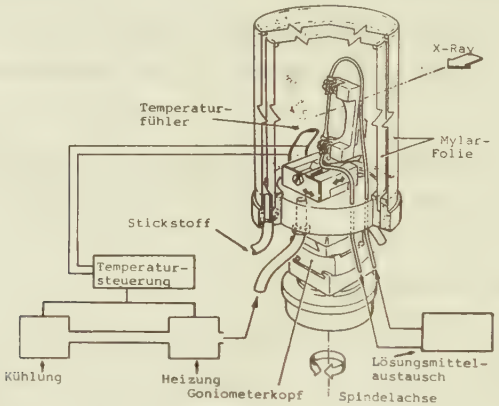


Abb. 3.5 zeigt den Aufbau einer Strömungszelle[42]

3.2.2.3 Strahlenschädigung

Trotz der sehr hohen Intensität der Synchrotronstrahlung hat sich gezeigt, daß gegenüber einer konventionellen Röntgenquelle 2-5 mal soviel Daten gesammelt werden können, bevor sich eine Strahlenschädigung bemerkbar macht [49]. Als Erklärung kann man annehmen, daß die die Strahlenschädigung verursachenden ·OH-Radikale in der relativ kurzen Meßzeit sich nicht über den ganzen Kristall verteilen können und dadurch entsprechend weniger Strahlenschädigung verursachen.

3.2.3 Polarisation

Synchrotronstrahlung ist aufgrund der in einer Ebene kreisenden Elektronen überwiegend parallel zu dieser Ebene polarisiert.

Diese partielle Polarisation muß bei der Reduktion der gemessenen Intensitäten durch einen entsprechenden Korrekturfaktor berücksichtigt werden. Für die Datensammlung mit der Rotationskamera wurde daher eine spezielle Polarisationskorrektur P_{SR} abgeleitet [63].

$$P_{SR} = P_O \cdot (1 - \tau \cdot \alpha)$$

$$P_O = \frac{(1 + \cos^2 2\Theta)}{2}$$

Polarisationskorrektur für unpolarisiert einfallende Strahlung

$$\tau = \frac{I_\parallel - I_\perp}{I_\parallel + I_\perp}$$

Verhältnis von paralleler ($I_\parallel$) zu vertikaler ($I_\perp$) Intensität nach der Monochromatisierung

$$\alpha = \sin^2 2\Theta \cdot \cos^2 2\Theta / (1 + \cos^2 2\Theta)$$

Θ: entspricht dem Winkel zwischen horizontaler Ebene und der Projektion des Strahl auf diese Ebene

Das Polarisationsverhältnis kann berechnet oder auch experimentell bestimmt werden [64]. Der Wert von τ liegt für den Meßstand X11 (Abb. 3.6) zwischen 0.6 und 0.8 . Er ist abhängig von den Fokussierungsparametern am Meßstand und der Strahlhöhe im Speicherring. Da die Strahlhöhe leichten Schwankungen unterliegt, läßt sich τ am sichersten aus den Diffraktionsdaten bestimmen. Durch Vergleich der Intensität symmetrieäquivalenter Reflexe eines Films kann dabei durch Minimisierung der Differenzen dieser Reflexe sehr gut ermittelt werden [65].

3.2.4 Zeitstruktur der Synchrotronstrahlung

3.2.4.1 Zeitauflösende Techniken

Synchrotronstrahlung wird in den Kreisbögen eines Beschleunigers nur beim Durchgang der Teilchenbündel ausgesandt und

tritt deshalb immer nur in diskreten Pulsen auf. Die Pulslänge und Periode hängt von den Abmessungen und den Betriebsparametern des Beschleunigers ab.
Bei DORIS beträgt die Pulslänge ungefähr 150 ps. Der Abstand zwischen zwei Pulsen schwankt zwischen 2 Nano-Sekunden im 'Multi-Bunch' Betrieb , bei dem mehrere Teilchenbündel gleichzeitig beschleunigt werden, und einer Mikro-Sekunde für den 'Single-Bunch' Betrieb. Diese gepulste Struktur wird bei normalen zeitintegrierten Messungen nicht bemerkt und berücksichtigt. Sie könnte jedoch für spektroskopische Untersuchungen von Übergangszuständen, die bei Raumtemperatur auf einer Zeitskala von 10^{-10} bis 10^{-6} Sekunden ablaufen, ausgenutzt werden. Anwendung fand die Zeitstruktur bisher nur bei der Untersuchung der photolytischen CO-Abspaltung aus Carbomonooxy-Myoglobin durch Laser-Impulse [42].

3.2.4.2 Thermodynamisch Diffuse Streuung

Nicht in jedem Fall erhält man mit Synchrotronstrahlung eine Steigerung der Bragg'schen Auflösung. Beispiele für diese Ausnahmen sind Strukturen, die infolge thermisch-diffuser Streuung (TDS) eine begrenzte Auflösung zeigen. TDS entsteht durch unelastische Streuung akustischer Phononen und macht sich durch eine Verbreiterung des Reflexprofils und eine Erhöhung der Untergrundstrahlung nachteilig bemerkbar [55]. Man nimmt an, daß bestimmte ungeordnete Bereiche einer Kristallstruktur zusammenhängend schwingen und in Resonanz zur gepulsten Synchrotronstrahlung geraten [54]. TDS enthält ergänzend zu den bei der Röntgenstrukturanalyse ermittelten Temperaturfaktoren

Information über die dynamische Molekülbewegung, welche sich möglicherweise bei genauer Untersuchung dieses Streuphänomens noch auswerten läßt.

3.3 Meßstände für die Proteinkristallographie am Speicherring DORIS

Für proteinkristallographische Anwendungen wurden vom EMBL in Hamburg bisher zwei Meßstände mit den Bezeichnungen X11 und X31 aufgebaut. X11 liegt auf der 'Positronenseite' von DORIS (siehe Abb. 3.3) und kann während der parasitären Strahlzeit benutzt werden. Während dieser Zeit, ungefähr 5-6 Monate im Jahr, wird der Speicherring mit 5 GeV und 30-40 mA betrieben. Die Lebenszeit einer Strahlperiode liegt dann bei ca. 1 Stunde. X31 liegt auf der 'Elektronenseite' im HASYLAB und kann sowohl in der parasitären als auch in der Hauptbenutzerzeit benutzt werden. Während der Hauptbenutzerzeit wird DORIS mit ca. 3.6 GeV und 80-100 mA betrieben. Die Lebenszeit einer Strahlperiode liegt dann bei ungefähr 5 Stunden. Die beiden Meßstände bestehen im Wesentlichen aus modifizierten Arndt-Wonacott-Kameras.
Ein stufenlos einstellbarer Kollimator erlaubt eine optimale Anpassung des Strahldurchmessers an die Kristallgröße und ermöglicht dadurch eine Reduzierung der Untergrundstreuung in Verbindung mit einer besseren Trennung der Reflexe [47]. Durch diese insgesamt optimale Kollimation wird einerseits die Datensammlung von sehr kleinen Kristallen und auch von Kristallen mit Zelldimensionen bis zu $\sim$1000 Å ermöglicht.
Da die Intensität der Synchrotronstrahlung in einer Strahlperiode langsam abfällt, kann die Kristallrotation während der Messung nicht, wie bei einer konventionellen Röntgenquelle, zeitabhängig

gesteuert werden. Um jeder Kristallrotation trotzdem den gleichen Photonenfluß zu zuordnen, wird die relative Anzahl der einfallenden Photonen zwischen Kollimator und Kristall mit Hilfe einer Ionisationskammer gemessen und an einen Kleinrechner weitergeleitet. Dieser gibt beim Erreichen eines vorher gewählten ´Preset´-Wertes einen Impuls an den Schrittmotor der Arndt-Wonacott-Kamera. Somit entspricht jeder Kristallrotation immer die gleiche Intensität bzw. Photonenzahl.

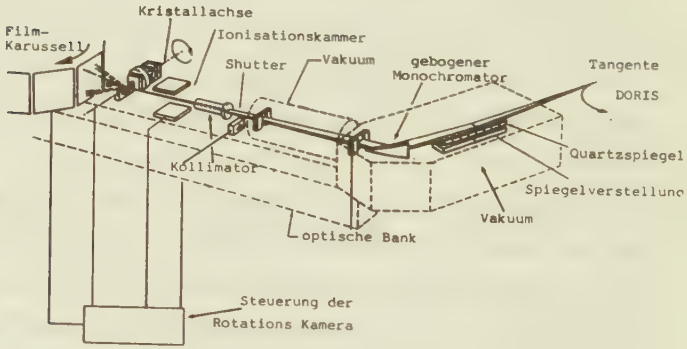


Abb. 3.6 zeigt schematisch den Aufbau von XII [46]. Acht Quarz-Spiegel fokussieren den Strahl in der vertikalen Ebene hinter dem Strahlaustrittspunkt (Tangentenpunkt). Mit einem gebogenen Ge(111) oder Si(222) Monochromator wird der Strahl in der horizontalen Ebene gebündelt und die Wellenlänge je nach Problemstellung auf 0.8 Å bis 2.4 Å eingestellt.

4. Röntgenstrukturanalyse und Verfeinerung von Proteinstrukturen

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Strukturverfeinerung lag, sollen die Methoden zur Strukturlösung an dieser Stelle nur kurz angeschnitten werden. Sie werden in zahlreichen Übersichtsartikeln und einigen Lehrbüchern ausgiebig beschrieben[40]. Für die Strukturverfeinerung von Proteinen stehen grundsätzlich mehrere Methoden zur Verfügung, die je nach Problemstellung einzeln angewendet oder auch kombiniert werden können.

4.1 Das Phasenproblem in der Proteinkristallographie

Die wichtigste Grundlage zur Kristallstrukturbestimmung mit Diffraktionsdaten besteht auf dem Zusammenhang von Strukturfaktor und Elektronendichteverteilung. Der Strukturfaktor F_{HKL} setzt sich aus der Strukturamplitude $/F_{HKL}/$ und einem zugehörigen Phasenwinkel α_{HKL} zusammen.

$$1. \quad F_{HKL} = /F_{HKL}/ \, e^{i\alpha}$$

Für den später aus den Atomkoordinaten theoretisch berechneten Strukturfaktor F_{ber} gilt folgender Zusammenhang:

$$2. \quad F_{HKL} = \sum_{j=1}^{N} f_j \, e^{2\pi i(hx+ky+lz)}$$

f_j : Atomformfaktor

Durch die periodische Anordnung einer Kristallstruktur läßt sich die Elektronendichteverteilung P als dreidimensionale Fourier-Synthese aus den Strukturfaktoren errechnen.

$$3. \quad P_{(x,y,z)} = \frac{1}{V} \Sigma\Sigma\Sigma F_{HKL} \, e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Einer Messung direkt zugänglich sind nur die zur Reflexintensität proportionalen Strukturamplituden $/F_{HKL}/$. Die Phasenwinkel dagegen lassen sich durch eine Messung nicht direkt ermitteln. Die heute bei kleinen Strukturen routinemäßig eingesetzten sogenannten 'direkten Methoden' können bei Makromolekülen nicht angewandt werden. Für eine Proteinstruktur gelang es als ersten D.M. Blow und F.H. Crick, anhand eines isomorph kristallisierenden Schweratomderivates die Phasenbeziehung zu lösen [82] . Auf der danach benannten Methode des isomorphen oder mehrfachen isomorphen Ersatzes (englisch MIR-Methode, multiple isomorphous replacement) basieren heute die meisten Programme zur Strukturbestimmung von Proteinen.

Falls die Kristallisation des nativen Proteins und von mindestens zwei oder besser mehreren isomorphen Schweratomderivaten erfolgreich war, läßt sich die Strukturaufklärung grob in die folgenden Schritte aufteilen:

1. Messung, Reduktion und Skalierung der Beugungsintensitäten, Ermittlung der Strukturamplituden des nativen Proteins ($/F_p/$).
2. Bestimmung der Strukturamplituden der Schweratome durch Subtraktion der nativen von den Schweratom-Derivat-($/F_{PH}/$)-Reflexamplituden.
3. Ermittlung und Verfeinerung der Schweratomparameter (Koordinaten, Temperaturfaktoren, Besetzungsfaktoren) aus den vorher bestimmten Streubeiträgen.
4. Bestimmung der Phasenwinkel für die Streuamplituden des nativen Proteins, wie in dem folgendem Diagramm dargestellt.
5. Errechnung der Elektronendichteverteilung des nativen Proteins durch eine Fourier-Synthese (83).
6. Interpretation der Elektronendichte und Anpassung eines Strukturmodells.

Der letzte Schritt wird heute meist mit den Hilfsmitteln der Computer-Grafik [80,81] ausgeführt.

Eine andere, aber nicht so häufig benutzte Methode der Phasenbestimmung ist die durch anomale Dispersion (siehe auch Absch. 3.2.1.1), auf die an dieser Stelle aber nur hingewiesen werden soll.

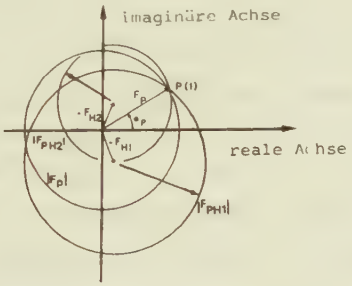


Abb. 4.1 Harker-Konstruktion zur Bestimmung des Phasenwinkels α_p. In der Ebene der komplexen Zahlen werden Kreise mit dem Radius F_p, F_{PH1}, F_{PH2}, um den Ursprung bzw. um die Enden der durch die Schweratombeiträge definierten Vektoren F_{H1} und F_{H2} gezogen. Der gemeinsame Schnittpunkt definiert den Phasenwinkel α_p .

4.2 Verfeinerung einer Proteinstruktur

Um eine dreidimensionale Struktur im Detail zu interpretieren, ist eine Verfeinerung unumgänglich. Die Güte eines Startmodells oder einer Verfeinerung läßt sich neben den zu beachtenden Parametern der Stereochemie durch den kristallographischen R- (Reliability) Faktor angeben. Dabei werden durch Summation über alle Reflexe die aus den Atomkoordinaten des Modells berech-

neten Strukturfaktoren mit den gemessenen wie folgt verglichen :

$$4. \quad R = \Sigma / F_{HKL}/_{gem} - / F_{HKL}/_{ber} / \Sigma / F_{HKL}/_{gem}$$

Je niedriger der R-Faktor liegt, um so besser ist die Struktur bestimmt. Ausgangsmodelle für Proteine haben meist eine R-Wert von 0.4 - 0.5 . Für völlig falsche Strukturmodelle liegt R bei $\sim$0.6 und je nach erreichbarer Auflösung für gut verfeinerte Modelle bei $\sim$0.2 .

Die kristallographische Verfeinerung biologischer Makromoleküle ist aufgrund der begrenzten Anzahl verfügbarer Diffraktionsdaten und der außergewöhnlichen Größe der Strukturen schwierig. Durch das ungünstige Verhältnis von gemessenen Daten gegenüber zu verfeinernden Parametern können die Atomparameter nicht, wie bei kleinen Strukturen üblich, unabhängig voneinander verfeinert werden. Für Proteinase K würden sich aus den ca. 2000 Atomen bei einer unabhängigen Verfeinerung aus den Koordinaten X,Y,Z und dem Temperaturfaktor B ca. 8000 zu verfeinernde Parameter ergeben, die bei einer Auflösung von 2.5 Å mit nur ca. 7000 Meßdaten verfeinert werden müßten.

Die zur Proteinverfeinerung entwickelten Computerprogramme umgehen dieses Problem durch Einbeziehung der bekannten Stereochemie, wie Bindungslängen, -Winkel und Torsionswinkel oder durch Einbeziehung von Potential-und Konformationsenergie. Bei gleichzeitiger Reduzierung des R-Faktors werden diese Parameter zusätzlich idealisiert.

Außer der in dieser Arbeit benutzten ('Restrained Least-Squares' ;beschränkte kleinste Quadrate) Methode sollen die verschiedenen anderen Verfeinerungstechniken an dieser Stelle nur aufgezählt werden. Sie werden in einigen Übersichtsartikeln ausgiebig be-

schrieben und verglichen [84,85]. Man unterscheidet grundsätzlich folgende Verfeinerungtechniken, die an dieser Stelle mit ihrer allgemein verwendeten englischen Bezeichnung aufgeführt werden :

a) Verfeinerung im realen Raum; ('Real Space Refinement)', (86)

b) Verfeinerung mit festgesetzten und beschränkten Parametern; ('Constrained-Restrained Least-Squares Refinement)', (87)

c) Energie-Verfeinerung im realen Raum; ('Real Space Energy Refinement') , (88)

d) Verfeinerung mit beschränkten kleinsten Quadraten ('Restrained-Least Squares Refinement') , (89)

4.2.1 Verfeinerung nach der Restrained Least-Squares Methode

Das nach der Methode der kleinsten Quadrate arbeitende Programmsystem PROLSQ (PROtein Least SQuares) wurde von H. Konnert aus einem routinemäßig zur Verfeinerung kleiner Strukturen benutzten Programm [90] entwickelt und von W.A. Hendrickson durch Einführung eines weiteren Programmteils, PROTIN (PROTein model INput) speziell für die Verfeinerung von Proteinen erweitert.
Die Philosophie des Programms beruht auf einer Minimierung der Differenz von berechneten und gemessenen Strukturfaktoren bei gleichzeitiger Optimierung der Stereochemie.
Die Funktion, die hierbei minimiert wird, setzt sich aus einem Strukturfaktorteil und aus einer Reihe von Termen zusammen, die die Stereochemie des Proteins in vorher festgelegten 'Schranken', den sogenannten 'Restraints', idealisieren.

$$5.\quad \Phi = \Phi_{diff} + \Phi_{bond} + \Phi_{plan} + \Phi_{chiral} + \Phi_{\substack{non \\ bonded}} + \Phi_{tor} + \Phi_{temp}$$

Die einzelnen zu minimisierenden Ausdrücke sehen dabei wie folgt aus :

$$\Phi_{diff} = \sum_{H}^{Reflexe} \frac{1}{\sigma^2 F(hkl)} \cdot (/F_{obs}/ - /F_{calc}/)^2$$

$\frac{1}{\sigma_F^2}$: Wichtungs-Faktor

σ_F : Standardabweichung von /F/

als zweckmäßiger für die Verfeinerung hat sich folgendes σ erwiesen:

$$\sigma_F \sim \frac{1}{2} <|F_{obs} - F_{calc}|>$$

oftmals wird auch folgender Ausdruck zur Strukturfaktorwichtung herangezogen:

$$\sigma = A + B \left(\sin\Theta / \lambda - 0.16667 \right)$$

wobei $A \sim 1/2 \; ||F_o| - |F_c||$
B wichtet den Reflexanteil entsprechend seiner Auflösung

$$\Phi_{bond} = \sum_{j}^{Bindungen} \cdot \frac{1}{\sigma_D^2} \cdot (d_j^{ideal} - d_j^{modell})^2$$

d_j : berechnete Abstände zwischen zwei Atomen A und B

$$d_j = |\vec{r}_A - \vec{r}_B|$$

σ_D : erwartete ideale Standardabweichung für den speziellen Bindungstyp

$$\Phi_{planar} = \sum_{k}^{Planes} \cdot \sum_{i}^{coplanar} \cdot \frac{1}{(\sigma_p^{i,k})^2} (\vec{m}_k \; \vec{r}_{ik} - d_k)^2$$

$\vec{m}_k, \vec{d}_k$: Parameter einer kleinsten-Quadrate-Ebene bezüglich einer bestimmten zugelassenen Standardabweichung

$$\Phi_{chiral} = \sum_{i}^{\text{chirale Zentren}} \frac{1}{\sigma^2_{Chi}} \cdot \left(V^{ideal}_{C_\alpha(i)} - V^{modell}_{C_\alpha(i)} \right)^2$$

V_{C_α} : chirales Volumen um das C_α-Kohlenstoffatom einer Aminosäure

$$V_{C_\alpha} = (\vec{r}_N - \vec{r}_{C_\alpha}) \quad (\vec{r}_C - \vec{r}_{C_\alpha}) \quad (\vec{r}_{C_\beta} - \vec{r}_\alpha)$$

Skalarprodukt der Vektoren vom zentralen C_α-Atom zu den drei benachbarten Atomen N, C, C_β

σ_{chi} : zugelassene Standardabweichung

$$\Phi_{non\text{-}bonded} = \sum_{m}^{non\ bonded} \frac{1}{\sigma^2_m} \left(d^{min}_m - d^{modell}_m \right)^2$$

d_{min} : minimal erlaubter Abstand zwischen zwei unverbundenen Atomen

d^{modell} : Abstand im Atommodell

$$\Phi_{Tor} = \sum_{T}^{Torsionswinkel} \frac{1}{\sigma^2_T} \cdot \left(X^{ideal}_T - X^{modell}_T \right)^2$$

X^{ideal}_T : ideale Torsionswinkel von Haupt-und Seitenketten

X^{modell}_T : aktuelle Torsionswinkel des Modells

σ_T : entsprechende Standardabweichung

$$\Phi_{temp} = \sum_{j}^{Bindungen} \frac{1}{\sigma^2_{B_i}} \cdot \left(B^{origin}_j - B^{target}_j \right)^2$$

$B = 8\pi\bar{u}^2$: mittlere thermische Atomauslenkung

σ_B : entspricht in der Größenordnung dem Unterschied der Schwingungsamplituden benachbarter Atome

$B^{Origon}_j ; B^{Target}_j$: Temperaturfaktoren von zwei durch eine kovalente Bindung verbundenen Atomen.

Bindungswinkel werden in der Verfeinerung auch durch die damit

verbundenen Atomabstände zu den übernächsten Nachbaratomen beschrieben und 'restrained'. Man bezeichnet solche Abstände dann als 1-3 - Abstände.

Da jede Proteinverfeinerung ein individuelles Problem darstellt, gibt es keine allgemeingültige Gewichtungsstrategie. Um ein der jeweiligen Problemstellung angepaßtes Gewichtungsschema zu erhalten, empfhielt es sich, zu Beginn jeder Verfeinerung einige 'Probeläufe' durchzuführen.

Bonding Distances			
Bond length	(1-2 neighbor)		σ_D = 0.02 Å
Angle-related distance	(1-3 neighbor)		0.04
Intraplanar distance	(1-4 neighbor)		0.05
Hydrogen bond or Metal coordination			0.05
Planar Groups			
Deviation from plane			σ_P = 0.02 Å
Chiral Centers			
Chiral volume			σ_C = 0.15 Å^3
Non-bonded Contacts			
Single torsion		σ_V = 0.50Å	Δd_{VDW} = -0.30
Multiple torsion		"	0.00
Possible hydrogen bond (X....Y)		"	-0.20
Possible hydrogen bond (X-H..Y)		"	-0.90
Torsion Angles			
Specified	(e.g. helix ϕ and χ)		σ_T = 15°
Planar	(e.g. peptide ω)		3
Staggered	(e.g. aliphatic χ's)		15
Transverse	(e.g. aromatic χ_2)		20
Thermal Factors			isotropic
Main-chain bond	(1-2 neighbor)		$\sigma_{\Delta B}$ = 1.0 Å^2
Main-chain angle	(1-3 neighbor)		1.5
Side-chain bond			1.0
Side-chain angle			1.5
Diffraction Data			
Structure factor modulus			$\sigma_F \sim \frac{1}{2}\langle \lvert \lvert F_{obs} \rvert - \lvert F_{calc} \rvert \rvert \rangle$

Tabelle 4.1 zeigt nach (79) für die verschiedenen Funktionsklassen ein typisches Gewichtsschema der einzelnen Sigmas.

5. Datensammlung für das Enzym Proteinase K

Um Elektronendichteverteilungen bis zu möglichst hoher Auflösung zu berechnen, wurden insgesamt drei Filmdatensätze erstellt. Für den ersten Schritt der Hochauflösungsstrukturanalyse wurde ein Datensatz bis 2.2 Å Auflösung mit konventioneller CuKα Röntgenstrahlung auf einem Drehanodengenerator erstellt. Diese Datensammlung diente neben der Anwendung zur Strukturanalyse hauptsächlich zur Einarbeitung in die Filmdatensammlung, sowie zur Installation und Überprüfung der Programme zur Filmdatenauswertung.

Zwei Datensätze wurden mit Synchrotronstrahlung bis zu hoher Auflösung gesammelt. Frühere Studien mit Synchrotronstrahlung hatten gezeigt [68], daß Proteinase K- Kristalle grundsätzlich bis zu einer Auflösung von 1.0 Å beugen. Das heißt, daß es prinzipiell möglich ist bis zu atomarer Auflösung vorzustoßen. Von diesen Ergebnissen ausgehend wurde daher versucht, am Meßstand X11 des EMBL (European Molecular Biology Laboratory) einen Datensatz bis zu ca. 1.0 Å Auflösung zu erhalten. Es zeigte sich jedoch, daß dieses optimistische Ziel unter den damaligen Meßbedingungen nicht zu erreichen war. Die Kristalle der Proteinase K zeigten am Anfang der Bestrahlungszeit durchaus eine maximale Auflösung von 1.0 Å, die jedoch nach kurzer Zeit auf 1.2-1.4 Å abfiel. Bei Versuchen, dennoch einen kompletten Datensatz bis 1.2 Å zu erhalten, mußten zahlreiche Proteinase K Kristalle benutzt werden, um den Kristall-Film-Abstand sowie den Rotationsbereich zu optimieren. Da von diesem Filmsatz die für eine Hochauflösungsuntersuchung erforderliche Qualität nicht zu erwarten war, wurde zu einem späteren Zeitpunkt ein Datensatz bis 1.5 Å

Auflösung gesammelt. Dieser Datensatz wurde ebenfalls am X11 erstellt und zeigte bei der Datenreduktion sehr gute Ergebnisse. Abbildung 5.2 A,B,C zeigt zusammen mit den jeweiligen Meßbedingungen je eine Rotationsaufnahme aus den drei Filmdatensätzen.

5.1 Kristallisation des nativen Enzyms zur Datensammlung

Proteinase K (E.C. 3.4.21.14) wurde von der Fa. Merck (Darmstadt) bezogen und von Dr. G.P. Pal für die Kristallisation durch Gelfiltration weiter aufgereinigt [66]. Kristalle ließen sich, wie schon früher beschrieben [67,68], ohne Probleme durch Mikrodialyse über Nacht züchten. Hierbei wird eine 10%ige Proteinase K Lösung in Dialyseröhrchen gegeben und gegen einen Puffer aus 50 mM Tris, 10mM $CaCl_2$, 1M $NaNO_3$ und 0.02% NaN_3 bei pH 6.5 dialysiert. Tetragonale bipyramidale Kristalle wachsen in diesen Röhrchen mit Abmessungen von bis zu 2x1.5x1.5 mm.

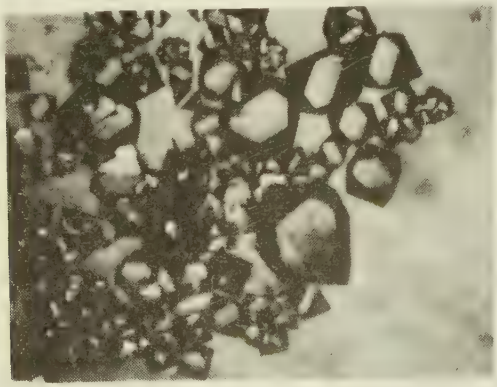
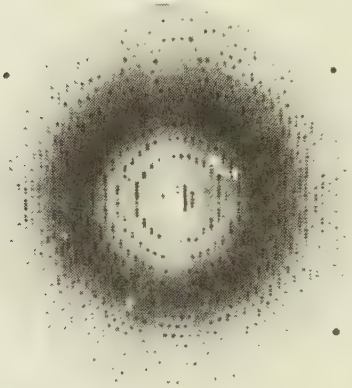


Abb. 5.1 zeigt einige Proteinase K Kristalle

Abb.5.2 Rotations-Aufnahmen von Proteinase K-Kristallen
Die Pfeile zeigen die jeweilige Auflösung an

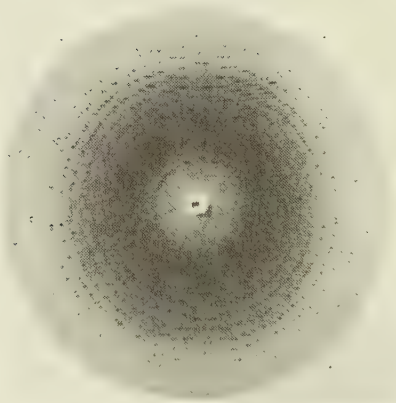


2.20 Å

3.00 Å

5.55 Å

Wellenlänge : 1.54182 Å
(Cu-K_α)
Kristall-Film Abstand : 70 mm
Drehwinkel : 2°
Bestrahlungszeit: 2.2 h

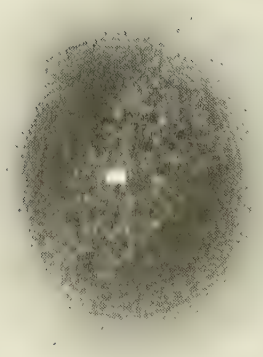


1.50 Å

2.10 Å

4.00 Å

Wellenlänge : 0.8655 Å
(Synchrotronstrahlung)
Kristall-Film Abstand : 90 mm
Drehwinkel : 0.5°
Bestrahlungszeit: ~ 8 min



1.13 Å

1.48 Å

2.65 Å

Wellenlänge : 0.918 Å
(Synchrtronstrahlung)
Kristall-Film Abstand : 55 mm
Drehwinkel : 0.5°
Bestrahlungszeit: ~ 20 min

Tabelle 5.1 Kristallographische Daten der Proteinase K

Raumgruppe	:	$P4_32_12$
a=b	:	68.1 Å
c	:	108.7 Å
α,β,γ	:	90°

Die Zellkonstanten wurden anhand von Präzessionsaufnahmen bestimmt.

Das Verhältnis des Volumens der asymmetrischen Einheit ($Å^3$) zum darin enthaltenen Molekulargewicht (Dalton) ergibt sich zu V_M : 2.16 $Å^3$/Dalton. Für den Lösungsmittelgehalt folgt daraus $V_S \sim 44\%$. Beide Werte zeigen gute Übereinstimmung mit den aus 116 Proteinkristallstrukturen bestimmten Mittelwerten von $V_M \sim 2.4$ und $V_S \sim 43\%$ [40]. Proteinase K Kristalle wurden für die Datensammlung in dünnwandigen Quarzkapillaren so montiert, daß die kristallographische c-Achse entlang der Rotationsachse bzw. Spindelachse lag. Um die Kristalle vor dem Austrocknen zu schützen, wurde an den Enden der Kapillaren etwas Mutterlauge hinzugegeben. Die Kapillaren wurden danach mit Hartwachs verschlossen und auf einen Goniometerkopf geklebt.

5.2 Datensammlung bis 2.2 Å mit dem Drehanoden-Generator

Vor Beginn der Messung wurde der Kristall mit Hilfe einer 3°Präzessionsaufnahme so einjustiert, daß die c-Achse entlang der Spindelachse φ lag und die a- oder b-Achse in Richtung des Röntgenstrahls zeigte. In dieser Orientierung beträgt der für einen kompletten Datensatz erforderliche Drehbereich 45° . Dabei werden die meisten Reflexe viermal gemessen, zwei als H,K,L und H,K,-L auf einem Film und zwei als -H,-K,L und -H,-K,-L auf einem anderen Film. Insgesamt wurden die Daten in Schritten von 2° pro

Rotationsaufnahme über einen Bereich von $\varphi = 0^{\circ}$ bis 50° gesammelt. Um die für die Datenreduktion erforderliche sehr genaue Kristallorientierung zu bestimmen, wurden zu Beginn der Messung Stillaufnahmen bei $\varphi = 0^{\circ}$,45° und 90° angefertigt. Die Bestrahlungszeit für eine Stillaufnahme betrug ca. 5 - 10 min. Weitere Stillaufnahmen wurden während der Messung nach jeweils 5 Rotationsaufnahmen aufgenommen, um bei einer möglichen Lageveränderung des Kristalls in der Kapillare die Orientierung nachbestimmen zu können. Bei der angestrebten Auflösung von 2.2 Å betrug der Kristall-Film-Abstand 70 mm. Die Bestrahlungszeit wurde bei einer Leistung von 40 kV und 70 mA des Drehanodengenerators auf 4000 sec pro Grad Drehung festgelegt. Die Beugungsreflexe hatten bei einem Kollimatordurchmesser von 0.6 mm infolge der Divergenz des Röntgenstrahls einen Durchmesser von ca. 1mm. Um den vollen dynamischen Intensitätsbereich zu erfassen, wurden in jede Filmkassette 3 Filme eingelegt. Bei der Auswertung werden sie üblicherweise als A-, B- und C-Film bezeichnet. Die belichteten Filme wurden entsprechend gekennzeichnet und wie folgt entwickelt:

1. 5 min. Entwicklerbad
2. 15 sec. Stopbad
3. 10 min. Fixierbad
4. 30 min. Wasserbad

und danach zum Trocknen in einen Trockenschrank aufgehängt. Um eine möglichst hohe Film- bzw. Datengualität zu erhalten, wurde die Entwicklungsprozedur mit äußerster Sorgfalt ausgeführt. Abgestimmt auf den Röntgenfilm DEF-2 von KODAK wurde der Entwickler mit der Bezeichnung D-19 von KODAK und der Fixierer G333-c von AGFA für die Entwicklung benutzt. Der gesamte Datensatz konnte mit einem Kristall innerhalb von knapp 3 Tagen gesammelt werden. Eine signifikante Strahlenschädigung war nach dieser Zeit nicht zu erkennen.

Tabelle 5.2 Zusammenfassung der Meßparameter

Generatorleistung	40 kV, 70 mA / 2.8 kW Fokus: $0.2*2mm^2$
Wellenlänge	CuK_α / Graphit Monochromator/ 1.54182 Å
Film	KODAK DEF 2
Filmkassetten	flach, maximaler Radius 60 mm
Kollimator	0.6 mm
Kristall-Film-Abstand	70 mm
maximale Auflösung	2.2 Å
totaler Drehwinkel	50°
Drehwinkel für jede Aufnahme	2°
Anzahl der Filme	75 (25 Aufnahmen mit je drei Filmen)
Bestrahlungszeit	4000 sec/Grad ; 2.2 h pro Aufnahme
gesamte Bestrahlungszeit des Kristalls	56 h

5.2.1 Filmauswertung

Die Rotationsfilme wurden im 100 µm Raster mit einem automatischem OPTRONICS P 1000 - Photometer im 3 OD-Bereich abgetastet und die digitalen Werte der Filmschwärzung zur Weiterverarbeitung auf Magnetband geschrieben. Die Datenauswertung wurde dann mit dem im Abschnitt 2 beschriebenen Programmsystem auf einem VAX 11/750 - Computer ausgeführt. Dazu wurde zuerst die Kristallorientierung mit Hilfe der Stillaufnahmen bei $\varphi = 0°$ und $90°$ aus dem durch die Markierungs-Punkte festgelegten Koordinatensystem und der Position von ca. 80 starken Reflexen bestimmt und anschließend zusammen mit den Zellparametern und dem Kristall-Film-Abstand F verfeinert. Es ergaben sich für F 70.05 mm und für die verfeinerten Zellkonstanten a,b = 68.17(6) Å und c = 108.26(6) Å.
Für jeden Film wurden anhand der Orientierungsmatrix die Reflexpositionen mit einer der Reflexform gut angenäherten Reflexfläche berechnet und anschließend integriert. Ein typischer Rotationsfilm enthielt im Mittel 2200 Reflexe, wovon ca. die Hälfte partiell beobachtet war.

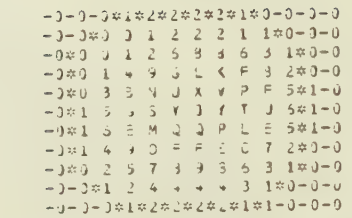


Abb. 5.3 zeigt ein durchschnittliches Reflexprofil mit der dazu optimierten Reflexfläche. Hierbei definieren 77 Punkte das Maximum und 34 Punkte den Hintergrund. Der Schwärzungsgrad bzw. die Intensität der Reflexe steigt von 0-9 und danach alphabetisch. Das Zentrum des Maximums wird durch ⌋ symbolisiert.

Die Bestrahlungszeit war so abgestimmt, daß im Durchschnitt nur 1-2 Reflexe auf dem C-Film die Sättigungsgrenze des Films überschritten und daher nicht ausgewertet werden konnten.
Nachdem die Integration für alle Filme ausgeführt war, wurden die Intensitäten für Lorentz- und Polarisationsfaktor korrigiert. Auf eine Absorptionskorrektur wurde verzichtet, da wegen der Kristallform die Transmissionsstrecke bei der Kristalldrehung um 50° annähernd gleich blieb.
Das Absorptionsverhältnis von Deckblatt und Röntgenfilm wurde vor der Datensammlung mit Hilfe eines abgeschwächten Primärstrahls auf einem Diffraktometer zu 0.12 und 3.0 bestimmt. Bei der Skalierung von A,B und C Film einer Kassette wurden diese Werte verfeinert und bei der Zusammenfassung der Intensitäten angewandt.
Für jede Roationsaufnahme wurde eine vollständige Analyse der Intensitäten erstellt, die schon in diesem Stadium zufriedenstellende Ergebnisse lieferte. Es zeigte sich, daß die Anzahl der Reflexe mit $I > 3\sigma$ bei 80-85 % und der R(I) Merge-Faktor für die Friedelpaare zwischen 5.5% und 6.5% lag.
Bei der anschließenden dreidimensionalen Skalierung und Datenmittelung wurden die partiellen Reflexanteile zusammengefaßt und relative Skalen- und Temperaturfaktoren für die einzelnen Filme nach der Methode von Fox und Holmes berechnet [34].

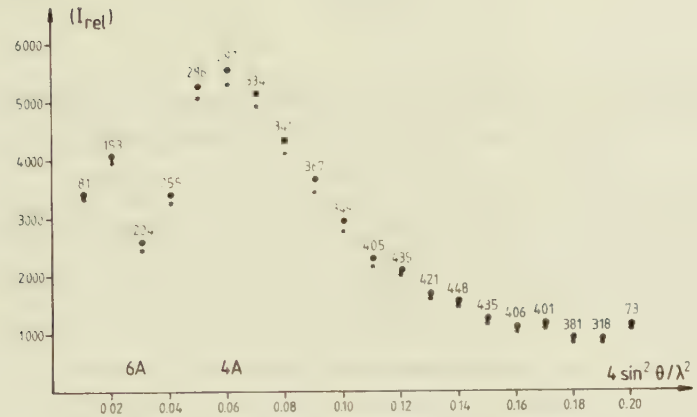


Abb. 5.4 zeigt die mittlere Intensität aufgetragen gegen $4 \sin \theta / \lambda^2$ für voll beobachtete Reflexe (★) und dazu equivalent die als Summe von zwei Anteilen gemessenen partiellen Reflexe (●) . Die Zahl über den Zeichen entspricht der Anzahl von verglichenen Reflexen in diesem Bereich. Bei 6 Å Auflösung ist ein charakteristisches Minimum und bei 4 Å ein Maximum zu erkennen.

Ein geringer Intensitätsunterschied zwischen voll und partiell erfaßten Reflexen wird ebenfalls deutlich. Die voll gemessenen Reflexe sind dabei systematisch schwächer. Die Intensitätsunterschiede liegen im Bereich von ein bis zwei Standardabweichungen und sind für die insgesamt gute Qualität des Datensatzes ohne Bedeutung.

Als Erklärung kann man eine leichte Ungenauigkeit in der Orientierungsmatrix vermuten, die dazu führt, daß einige Reflexe als voll erfaßt berechnet werden, in Wirklichkeit aber mit zwei partiellen Anteilen auftreten, von denen dann nur der Hauptteil integriert wird.

Durch die tetragonale Symmetrie der Proteinase K-Kristalle und der daraus folgenden Datenmittlung über vier äquivalente Reflexe werden geringfügige durch Absorption und Strahlenschädigung auftretende Effekte ausgeglichen. Der R(I)-Mittelungs (Merge)-Faktor von 8.85% kann als zufriedenstellend angesehen werden.

Tabelle 5.3 Ergebnisse der Datensammlung

Gesamtzahl der Reflexe		41304
davon unabhängig gemittelt		11520
$R(I)\ \sum_{i=1}^{N} /\bar{I}-I_i// \sum_{i=1}^{N} I_i$		8.85%
bei der Mittelung sind Reflexe mit $/\bar{I} - I_i/<4\sigma$ nicht berücksichtigt		394
Reflexe mit negativer Intensität		204
Reflexe grösser	1σ	11510
	2σ	11299
	3σ	10876

Insgesamt bestand der gemittelte Datensatz aus 95 % der theoretisch messbaren Reflexe.

Ein Vergleich dieser Daten mit den zur Strukturlösung auf einem Diffraktometer gesammelten Intensitäten, bei denen insgesamt 5 Datensätze gemittelt wurden [76], ergab für 6429 vergleichbare Strukturamplituden zwischen 15.0 Å und 2.8 Å Auflösung einen R-Wert von 5.8 % . Diese zufriedenstellende Übereinstimmung zeigt die Güte dieser Filmauswertung und belegt, daß Hard- und Software zuverlässig arbeiten.

Man kann sogar zusätzlich davon ausgehen, daß die Güte der Filmdaten die der Diffraktometerdaten übertrifft, da die Filmdaten innerhalb relativ kurzer Zeit von nur einem Kristall gesammelt wurden. Bei den Diffraktometermessungen lag die Meßzeit im Bereich einer Woche, wodurch die Effekte durch Strahlenschädigung wesentlich größer sind. Außerdem lassen sich bei der Mittelung mehrerer Datensätze, die von verschiedenen Kristallen gesammelt wurden, Skalierungs-Ungenauigkeiten nicht ausschließen.

5.3 Datensammlung mit Synchrotronstrahlung

5.3.1 Datensammlung bis 1.1 Å

Wie schon vorher erwähnt, wurde versucht, am Messstand X11 des EMBL einen Datensatz bis zu 1.0 Å zu sammeln. Neben des schnellen Abfalls der maximalen Auflösung von 1.1 Å auf 1.4 Å machten sich die für eine Synchrotronquelle relativ langen Bestrahlungszeiten nachteilig bemerkbar. Die damit verbundene hohe Untergrundstreuung pro Rotationsaufnahme hatte eine starke diffuse Filmschwärzung (siehe Abb. 5.2 C) zur Folge, die eine sinnvolle Datenauswertung unmöglich machte.

Tabelle 5.4 Zusammenfassung der Messparameter

Meßplatz	X11 EMBL Hamburg
Wellenlänge	0.918 Å
Film	KODAK DEF 2
Filmkassetten	flach, maximaler Radius 60 mm
Kollimator	0.3 mm
Kristall-Film Abstand	55 mm
maximale Auflösung	1.1 Å
Drehwinkel für jede Aufnahme	0.5°
Anzahl der Filme	420 (140 Aufnahmen mit je 3 Filmen)
Leistung DORIS	5 GeV, 30 mA
Intensität am Kristall	9×10^{8} Photonen/sec
Strahlzeit am Kristall	~20 min

5.3.2 Datensammlung bis 1.5 Å

Nach dem ersten Mißerfolg wurde bei der nächsten Messung mit Synchrotronstrahlung die Auflösungsgrenze von Anfang an auf die mit Sicherheit zu erreichende Grenze von 1.5 Å festgelegt. Der Speicherring DORIS wurde während der Messung mit 5 GeV und 30-40 mA betrieben. Daraus folgte für den Meßstand X11 bei einer Wellenlänge von 0.8655 Å ($\Delta\lambda/\lambda$=0.001) und einem Kollimatordurchmesser von 0.35 mm eine Intensität von 9×10^{8} Photonen/sec am Kristall. Der Kollimator wurde so eingestellt, daß die Reflexe auf dem Film einen Durchmesser von ca. 0.8 mm hatten. Dieses

für die Messung mit Synchrotronstrahlung relativ breite Reflexprofil wurde absichtlich so vorgewählt, damit die Digitalisierung der Filmschwärzung im 100 µm-Raster vorgenommen werden konnte. Das für die Auswertung schmalerer Reflexe erforderliche 50 µm-Raster hätte aufgrund der benötigten Massenspeicherkapazität eine Filmauswertung an der VAX 11/750-Rechenanlage in Berlin unmöglich gemacht.

Zur Orientierungsbestimmung wurden wieder zu Beginn der Messung zwei Stillaufnahmen bei 0° und 90° angefertigt. Die genaue Einjustierung des Kristalls war schon vorher mit Hilfe von Präcessionsaufnahmen auf einem Drehanodengenerator vorgenommen worden. Der Drehwinkel wurde auf 0.5° pro Rotationsaufnahme festgelegt. Nach einigen Testaufnahmen wurde jeder Rotation über eine Ionisationskammer eine Zählrate von 1.1×10^{7} zugeordnet, welche einer mittleren Bestrahlungszeit von ca. 8 min. entsprach.

Insgesamt wurden über einen Messbereich von 48° entsprechend 96 Rotationsaufnahmen und 30 Stillaufnahmen innerhalb von nur 15 Stunden mit einem Kristall aufgenommen.

Da die Absorption der Röntgenfilme bei der verwendeten Wellenlänge nicht ausreichte, um den vollen dynamischen Reflexbereich mit drei Filmen pro Kassette zu erfassen, wurden zwischen die Filme dünne Stahlfolien gelegt. Nach der Messung wurden die Absorption von Deckblatt, Film und Stahlfolie im abgeschwächten Primärstrahl mit Hilfe eines Elektrometers bestimmt. Der Absoptionsfaktor für den Film ergab sich zu 1.6 und für die Folie zu 3.5 . Das Deckblatt zeigte bei dieser Wellenlänge keine signifikante Absorption.

Um die vor der Messung angegebene Wellenlänge vom 0.86 Å sicherheitshalber zu überprüfen, wurde mit einem dünnen Wolframdraht abschließend eine Wellenlängenbestimmung ausgeführt. Dazu wurde der Wolframdraht auf einer provisorisch konstruierten

Halterung im direkten Strahlengang zentriert und die erzeugten Beugungsringe auf einem Film registriert. Aus dem Durchmesser der Beugungsringe, dem Draht-Film-Abstand und den für Wolfram bekannten Gitterebenenabständen ließ sich die Wellenlänge zu 0.87(1) Å bestimmen.

Tabelle 5.5 Zusammenfassung der Messparameter

Meßplatz	X11 EMBL Hamburg
Leistung DORIS	5.1 GeV, 30-40 mA
Film	KODAK DEF-2
Filmcassetten	flach,maximaler Radius 60 mm
Wellenlänge	0.8655 Å
Kollimator	0.35 mm
Kristall-Film Abstand	90 mm
Drehwinkel pro Aufnahme	0.5°
maximale Auflösung	1.5 Å
Anzahl der Filme	282 (94 Aufnahmen mit je 3 Filmen)
Strahlzeit pro Aufnahme	~8 min
insgesamt	13 h

5.3.2.1 Filmauswertung

Bei Verwendung von Synchrotronstrahlung wird die Bestimmung der Kristallorientierung oft zum Problem, da die Wellenlänge nicht genau genug bekannt ist und somit als weiterer Parameter bestimmt und verfeinert werden muß.
Mit den Stillaufnahmen von 0° und 90° konnte die Orientierung jedoch nach einigen Anläufen zufriedenstellend ermittelt werden.
Der Kristall-Film Abstand wurde zu 89.26 mm und die Zellkonstanten zu a,b = 68.33(7) Å und c = 108.34(6) Å bestimmt. Die Wellenlänge konnte gleichzeitig auf einen Wert von 0.8655 Å verfeinert werden.
Um für die zumeist relativ schwachen Hochauflösungsreflexe (Abb.5.2B) eine gute Intensitätsauflösung zu erreichen, wurden die Rotationsfilme im 0 bis 2 OD-Raster digitalisiert.
Anschließend wurden, wie schon bei den 2.2 Å-Filmdaten beschrieben, die Reflexpositionen für jedes Filmpack berechnet und die Film-

schwärzung über eine vorher optimierte Reflexfläche integriert. Die Sättigungsgrenze wurde auf dem C-Film wieder nur in wenigen Fällen mit 1-2 Reflexen überschritten.

Pro Rotationsfilm wurden im Mittel 2100 Reflexe bestimmt und integriert. Das Verhältnis von voll zu partiell gemessenen Reflexen lag bei ca. 0.4 .

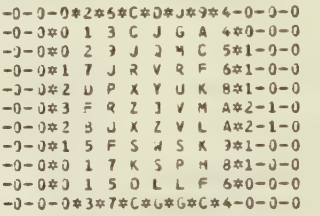


Abb. 5.5 zeigt ähnlich zu Abb. 5.3 eine optimierte Reflexfläche mit 63 Punkten im Maximum und 48 Punkten im Hintergrund.

Nach der Integration wurden die Intensitäten der A-,B- und C-Filme zusammengefaßt, wobei das vorher ermittelte und verfeinerte Absorptionsverhältnis von Film und Stahlfolie berücksichtigt wurde. Die Intensitäten wurden vorher außerdem für Lorentz- und Polarisationsfaktor korrigiert. Eine Absorptionskorrektur konnte wegen der kurzen Wellenlänge entfallen. Um die Polarisation T der Synchrotronstrahlung zu berücksichtigen, wurde das Programm ROTCOR (siehe Abb. 2.4) geändert und für eine interaktive Eingabe eingerichtet. Eine Testreihe mit verschiedenen Werten von 0.60-0.80 erbrachte mit $T = 0.65$ den besten Mittelungsfaktor, welcher für die Friedel-Reflexpaare eines Rotationsfilms zwischen 3% und 5% lag. Die Anzahl der Reflexe mit $I \geq 3\sigma$ war mit 65% - 70% schon deutlich geringer als bei den 2.2 Å Daten. Die dreidimensionale Skalierung und anschließende Datenmittelung über 116040 Reflexe ergab einen R(I)-Faktor von 8.8%, der für Daten bis zu hoher Auflösung als außerordentlich gut angesehen werden kann.

Tabelle 5.6 Ergebnisse der Datensammlung

Gesamtzahl der Reflexe	116040
davon unabhängig gemittelt	36039
R(I)	8.8 %
bei der Mittelung sind Reflexe mit $\lvert\bar{I} - I_i\rvert < 4\sigma$ nicht berücksichtigt	627
Reflexe mit negativer Intensität	1058
Anzahl der Reflexe grösser 1σ	36014
2σ	35349
3σ	32096

Der gemittelte Datensatz enthält 95% der theoretisch messbaren Reflexe.

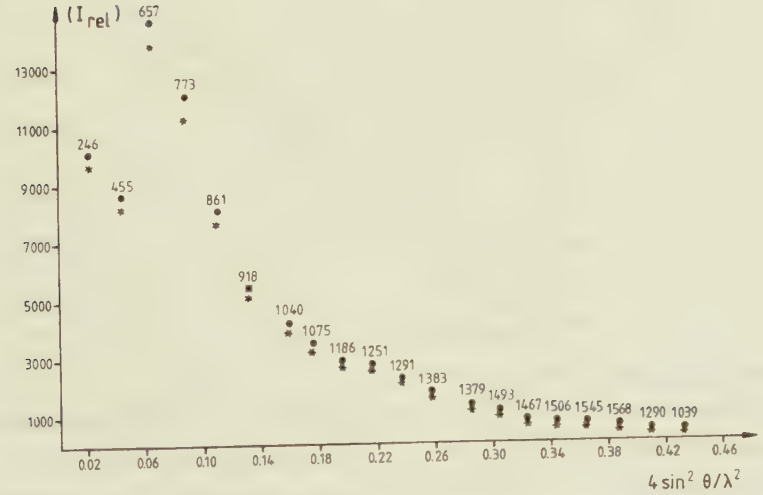


Abb. 5.6 zeigt wie schon vorher Abb. 5.4 die mittlere Intensität in Abhängigkeit von $4 \sin \theta / \lambda^2$ für voll ✱ und partiell ● beobachtete Reflexe.

Die Intensität der partiell gemessenen Reflexe liegt wieder leicht über der Intensität der voll gemessenen. Für die Daten bei höherer Auflösung, auf denen bei dieser Messung besonderes

Gewicht lag, liegen die Abweichungen innerhalb einer Standardabweichung. Dies bedeutet, daß die Kristallorientierung und die Wellenlänge im 1. Schritt der Datenauswertung sehr genau bestimmt wurden.

Ein Vergleich der Synchrotrondaten mit den auf der Drehanode gesammelten Filmdaten ergab für 10694 vergleichbare Reflexe bis 2.2 Å einen durchaus akzeptablen R(I)-Wert von 8.1 % . Ein weiterer Ausdruck für die Güte der Synchrotrondaten ist der sogenannte Wilson-Plot [69], bei dessen Berechnung alle 36039 Daten einbezogen wurden.

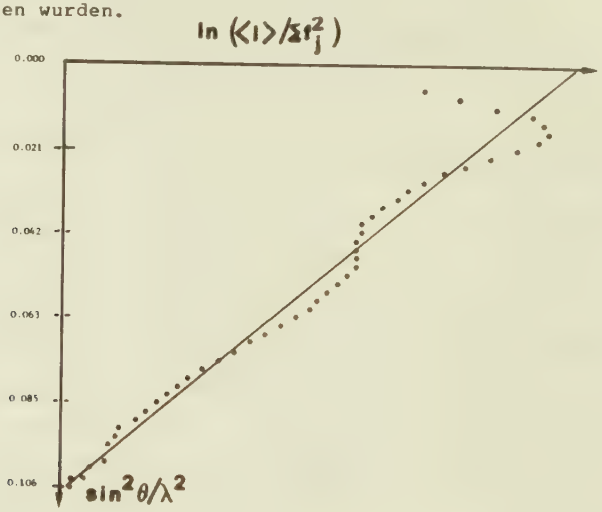


Abb.5.7 Wilson-Plot

Die Werte für ln $(\overline{I}/\sum f_j^2)$ lassen sich nahezu über den ganzen Auflösungsbereich, bis auf die durch Sekundärstruktur beeinflußte Region zwischen 4 Å und 6 Å, sehr gut durch eine Gerade annähern. Dies wird bei Proteinstrukturen nur in seltenen Fällen erreicht und ist neben der sorgfältig ausgeführten Filmdatenauswertung auf die außergewöhnlich gut beugenden Proteinase K Kristalle zurückzuführen. Der aus dem Wilson-Plot ermittelte allgemeine Temperaturfaktor von B = 12.2 $Å^2$ wurde in der späteren Verfeinerung sehr gut bestätigt.

6. Modellbau und Verfeinerung

6.1 Modellbau

Alle Schritte des Modellbaus und die später während der Verfeinerung angebrachten Korrekturen und Erweiterungen wurden mit dem Programmsystem FRODO [80,81] in Verbindung mit einem rechnergesteuerten Grafik-Gerät PS300 der Fa. Evans § Sutherland (Salt Lake City,USA) ausgeführt. Das Programmsystem enthält eine Bibliothek, welche die atomare Zusammensetzung sowie die ideale Stereochemie aller Aminosäuren enthält, so daß beliebige Aminosäurensequenzen erzeugt und nach einer Anpassung in die Elektronendichte entsprechend idealisiert werden können. FRODO ermöglicht im interaktiven Betrieb bei gleichzeitiger Darstellung von bis zu drei verschieden berechneten Elektronendichten eine Modellierung einzelner Atome bis hin zu ganzen Molekülfragmenten. Desweiteren können alle Atomparameter und geometrischen Daten jederzeit interaktiv abgefragt werden.

Zu Beginn des Modellbaus lag nur die Faltung und der Verlauf der Polypeptidkette anhand von 266 grob definierten C_α-Atomlagen vor. Die Sequenz war zu diesem Zeitpunkt nur in einigen kurzen Fragmenten bekannt [78], deren genaue Lage in der Gesamtsequenz leider auch noch nicht absolut sicher war. Nur im aktiven Zentrum konnten durch Vergleich mit Subtilisin einige Aminosäuren eindeutig der Elektronendichte zugeordnet werden. Im ersten Stadium des Modellbaus wurden 1120 Atome von insgesamt ca. 2000 Proteinatomen einer 2.8 Å MIR-Elektronendichte angepaßt. Dieses Ausgangsmodell setzte sich aus 230 Peptideinheiten und einigen gut definierten Seitenketten zusammen. Um möglichst wenig Fehler in das Modell und damit in die nachfolgenden Phasenwinkel-Berechnungen einzubringen, wurden in allen Schritten des Modellbaus nur sicher zu lokalisie-

rende Peptideinheiten und Seitengruppen der jeweiligen Elektronendichte angepaßt. Aminosäuren, für deren Seitengruppen sich schon Elektronendichte 'abzeichnete', aber noch nicht vollständig vorhanden war, wurden zunächst als Alanin angesehen.

Zu den schlecht zu interpretierenden Bereichen der Elektronendichte gehörten Anfang und Ende der Polypeptidkette, sowie einige Schleifen im Außenbereich und der für die Substratbindung verantwortliche Bereich 130-133 . Die Geometrie des Startmodells wurde in einigen Verfeinerungszyklen idealisiert. Der Start R-Faktor lag bei 52% für 5200 Reflexdaten zwischen 5 Å und 2.8 Å . Die Daten zwischen 5 Å und ∞ wurden für die Elektronendichteberechnungen und Verfeinerung nicht benutzt, da in diesem Bereich der Streuanteil von ungeordnetem Lösungsmittel und Sekundärstrukturelementen überwiegt, und die Daten damit für eine Strukturverfeinerung zuerst unbrauchbar waren.

Ein Versuch, das Proteinmodell anhand einer Elektronendichte mit den Koeffizienten $2F_o - F_c$ und α_c zu verbesseren, war in diesem Stadium erfolglos, da die Qualität der aus den Koordinaten berechneten Phasenwinkel noch nicht ausreichend war. Um diesen Zustand zu überbrücken und die Elektronendichte sinnvoll zu verbessern, ist eine Phasenkombination der berechneten Phasen α_c und der durch multi-isomorphen Ersatz bestimmten Phasen α_{MIR} sinnvoll.

Die Phasenwinkelkombination wurde nach dem von Hendrickson und Lattmann entwickelten Algorithmus ausgeführt [91]. Sie ergab einen mittleren Phasenwinkelunterschied von 58° zwischen α_c und α_{MIR} . Dieser Wert liegt im Rahmen des zu erwartenden und wurde ähnlich auch bei anderen Strukturverfeinerungen beobachtet [92,93] .

Die berechneten Phasenwinkel wurden bei Kombination nach einem von Sim entwickelten Schema gewichtet [94]. Hierbei werden in erster Linie die berechneten Phasenwinkel entsprechend ihrem Anteil zur

Gesamtstruktur gewichtet. Die nach dieser Prozedur erhaltene kombinierte Elektronendichte (sogenannte 'Combined-Map') ließ sich in den meisten der bis dahin noch unklaren Bereichen besser deuten.

Genau zu diesem Zeitpunkt war auch die vollständige Sequenzanalyse der Proteinase K unter der Leitung von Prof. Dr. Jany am Institut für organische Chemie der Universität Stuttgart abgeschlossen und unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise vor der Veröffentlichung [95,96] zur Verfügung gestellt, so daß diese Information nun in den Modellbau mit einbezogen werden konnte.

Das Modell wurde vollständig überarbeitet und danach schrittweise erweitert. Wichtige Anhaltspunkte dabei waren die beiden in der Elektronendichte gut zu erkennenden Disulfidbrücken .

Es sei an dieser Stelle schon erwähnt, daß durch die Hochauflösungsstrukturanalyse an insgesamt drei Stellen Fehler in der chemischen Sequenzanalyse entdeckt werden konnten. Dies führte auch insgesamt zu einer Erweiterung der Polypeptidkette von 277 in der Sequenzanalyse ermittelten auf entgültig 279 Aminosäuren (siehe Abb. 11.2). Die durch die Hochauflösungsverfeinerung entdeckten Änderungen wurden nach Abschluß dieser Arbeiten durch die Sequenzanalyse des klonierten Gens bestätigt [97] . Um möglichst alle Aminosäuren und Seitengruppen der Elektronendichte zuzuordnen, mußten für jede einzelne Überarbeitung des Modells die Differenz ($F_O - F_C$) und $2F_O - F_C$-Elektronendichten berechnet werden. Daneben wurde in den späteren Stadien zunehmend die sogenannte Auslaß-Dichte ('OMITMAP')-Prozedur [98] zur Überprüfung einzelner Regionen angewandt. Hierbei wurden jeweils bis zu zehn Aminosäuren bei der Phasenwinkelberechnung ausgeschlossen und in einer anschließend berechneten $F_O - F_C$ Dichte überprüft. Es zeigte sich nämlich, daß selbst im fortgeschrittenen Stadium der Strukturanalyse eine

$2F_O - F_C$ -Elektronendichte nicht immer verläßlich ist und durch den Einfluß der aus falschen Koordinaten berechneten Phasenwinkel eine oft trügerisch, falsche Dichte resultiert. Größere Ungenauigkeiten im Modell führen im Extremfall sogar dazu, daß die berechneten Phasenwinkel für die Reflexe höherer Auflösung schlechter werden und dadurch die effektive Auflösung geringer wird. Nach jeder Überarbeitung am Grafik-Gerät wurde das jeweils erhaltene Proteinmodell in einigen Zyklen der kleinste-Quadrate Verfeinerung idealisiert und teilweise verfeinert. Diese Arbeitsweise wurde solange fortgesetzt, bis die Polypeptidkette mit vorläufig 275 Aminosäureresten und insgesamt 1917 Atomen recht gut bestimmt war. Dazu gehörten auch der Anfang des Proteins, der in der ersten Interpretation [76] fälschlicherweise durch die starke Dichte einer Tryptophanseitenkette in die falsche Richtung gelenkt worden war. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte leider immer noch nicht die Lage von 17 Seitengruppen, die zumeist an der Oberfläche des Proteins lagen, und der Verlauf der letzten drei Reste am C-Terminus lokalisiert werden.

Das hier in Kürze beschriebene Vorgehen zum Modellbau war der zeit- und arbeitsintensivste Schritt der Strukturanalyse, ist in dieser Weise jedoch unbedingt erforderlich, um eine gute Basis für die folgende Hochauflösungstrukturanalyse zu erhalten. Es hat sich nämlich oft gezeigt, daß sich sogar in großen Teilen falsch interpretierte Proteinstrukturen sich bis zu einem leider oft akzeptierten R-Wert von 25 - 30% verfeinern lassen. Solche Arbeiten basieren zumeist auf nachlässig oder auch überinterpretierten MIR-Elektronendichten und auch auf gerade in früherer Zeit ohne die Hilfsmittel der Computer-Grafik ausgeführte Modell-Anpassungen. Hierzu ein Zitat: " What we learned was that serious errors can persist at a respectable R-factor around 20% at 2 Å resolution " (113) .

Abb. 6.1 Labquip-Modell der Proteinase K

Zum Abschluß dieser Arbeiten wurde zu Anschauungs- und Demonstartionszwecken mit einem Peptidbausteinsatz der Firma Labquip (Reading, England) ein Strukturmodell der Proteinase K im Maßstab 1cm = 1 Å anhand der schon partiell verfeinerten Koordinaten gebaut. Dieses Modell zeigt den kompakten, globulären Aufbau der Proteinase K.

6.2 Verfeinerung

Zu Beginn der Verfeinerung wurden einige Testberechnungen zur Bestimmung eines optimalen Gewichtungsschemas durchgeführt. Die dadurch ermittelten auflösungsabhängigen Gewichtungsparameter der Strukturfaktoren wurden aufgrund zufriedenstellender Ergebnisse während der ganzen Verfeinerung unverändert beibehalten. Die Gewichte der stereochemischen Parameter wurden zum Ende der Verfeinerung langsam erhöht, um eine bestmögliche Idealisierung der Struktur zu erreichen. Das während des Modellbaus zur Verfeinerung der partiellen Struktur benutzte PROLSQ-Programmsystem benötigte

schon bei einer Auflösung von 2.5 Å ~8 h Rechenzeit pro Verfeinerungszyklus auf der VAX 11/750. Der zeitintensivste Schritt, der ca. 90 % der Gesamtrechenzeit in Anspruch nahm, war hierbei die Strukturfaktorberechnung. Um eine schnellere und effektivere Verfeinerung zu erreichen, wurde daher eine überarbeitete PROLSQ-Version implementiert, die vor allem in der raumgruppenspezifischen Strukturfaktorberechnung optimiert war [103]. Die Rechenzeit auf der VAX 11/750 lag mit dieser Version bei 2.5 h Rechenzeit bei 2.5 Å und bei ~10h Rechenzeit für alle Daten bis 1.5 Å Auflösung am Ende der Strukturverfeinerung.

Der Gang der Verfeinerung läßt sich in 8 Stufen unterteilen, wobei insgesamt 113 'Least-Squares' Zyklen berechnet wurden. Reflexintensitäten mit $F < 3\sigma(F)$ wurden hierbei von allen Berechnungen ausgeschlossen. Die Auflösung wurde in vier Schritten durch schalenweises Hinzuziehen von Diffraktionsdaten bis auf 1.5 Å erhöht. Am Ende jeder Verfeinerungsstufe wurde das Modell anhand von $2F_O - F_C ; \alpha_C$ und $F_O - F_C ; \alpha_C$ - Elektronendichten am Grafik-Gerät überprüft. Besonderes Augenmerk lag dabei auf den Bereichen noch fehlender oder undeutlicher Elektronendichte für die noch nicht erkannten Seitenketten. Durch Änderungen und Einschübe am Modell änderte sich die Numerierung der Aminosäuren noch insgesamt viermal. Die im folgenden aufgeführten Bezeichnungen beziehen sich jedoch immer auf die letzte und endgültige Aminosäurennumerierung.

Nach Abschluß der Verfeinerung wurden noch einige Zyklen mit allen Daten bis 1.5 Å mit $F > 1\sigma(F)$ gerechnet. Tabelle 6.1 gibt eine chronologische Zusammenfassung der Verfeinerung wieder und Abb. 6.2 zeigt dazu den Verlauf des R-Faktors. Die einzelnen Arbeiten und Ergebnisse werden im folgenden zusammenfassend wiedergegeben.

6.2.1 Gang der Verfeinerung

Stufe 1 :

In der ersten Stufe der Verfeinerung wurde das aus 1917 Atomen bestehende Proteinmodell im Auflösungsbereich von 5.0 Å bis 2.5 Å mit 7369 Reflexintensitäten verfeinert. Hierzu wurden die auf dem Drehanodengenerator gesammelten Filmdaten benutzt. Die Daten wurden vorher skaliert. Der R-Faktor konnte hierbei von 45.4 % auf 29 % reduziert werden. Neben den Atomkoordinaten wurde noch der Skalenfaktor und der allgemeine Temperaturfaktor verfeinert. Zusätzlich zur Stereochemie der einzelnen Aminosäuren wurden alle bis dahin bekannten O - N Wasserstoffbrücken der Faltblatt- und der Helixbereiche sowie der S-S Abstand in den beiden Disulfidbrücken auf die Idealwerte begrenzt.
Bei der anschließenden Durchsicht der Elektronendichte konnten schon 76 Wassermoleküle (im folgenden auch als OW bezeichnet) lokalisiert werden und in die anschließende Verfeinerung mit einbezogen werden. Durch Einschübe und Erweiterungen konnten außerdem noch insgesamt 40 weitere Proteinatome zusätzlich bestimmt werden.

Stufe 2 :

Nach Erweiterung der Auflösung von 5.0 Å auf 2.3 Å wurde das Proteinmodell und der bis dahin gefundene Lösungsmittelanteil gegen 9647 Reflexe in 12 Zyklen bis zu einem R-Wert von 29.1 % verfeinert. Um beim Wechsel auf die Synchrotrondaten von einem möglichst gut idealisierten Proteinmodell ausgehen zu können, wurde während dieser Berechnungen ein stärkeres Gewicht auf die Parameter der Stereochemie gelegt.

Stufe 3 :

Bei der Durchsicht der Elektronendichten ließen sich leider keine eindeutigen Erweiterungen des Proteinmodells vornehmen. In den kritischen Bereichen am Ende der Struktur und in den Außenbereichen um die Reste 204 - 208, 180 - 183, 24 - 27 und 60 - 62 zeichnete sich jedoch schon eine deutliche Änderung zur chemisch ermittelten Sequenz ab.

Bei der Erhöhung der Auflösung wurde von den konventionellen Diffraktionsdaten auf die Synchrotrondaten gewechselt. In einem Auflösungsbereich von 5.0 Å - 2.0 Å wurde dann die Struktur in 22 Zyklen gegen 13697 Daten verfeinert. Hierbei wurden nach 10 Zyklen anstelle des allgemeinen die individuellen Temperaturfaktoren verfeinert. Die Verfeinerung konvergierte in diesem Stadium bei einem R-Wert von 23.1 % . Bei der folgenden Inspektion der Elektronendichte konnten die individuell verfeinerten Temperaturfaktoren auch als weiteres Güte-Kriterium bei der Interpretation der Elektronendichte herangezogen werden. Einige bisher ungenau lokalisierte Seitengruppen zeichneten sich durch überhöhte Temperaturfaktoren mit B Werten um 30 $Å^2$ aus und mußten neu angepaßt werden. Dazu zählte auch der gesamte sekundäre Substrat-Bindungsbereich.

Stufe 4 :

Nach der Neuorientierung einiger Seitenketten wurde die Auflösung auf 1.8 Å angehoben. Die Verfeinerung konvergierte nach 12 Zyklen bei einem R-Wert von 23.2 % für 20427 Reflexe.

Um auch die letzten Unsicherheiten in der Aminosäure-Sequenz des Enzyms zu beseitigen, wurde in diesem Stadium eine detaillierte Durchsicht des Strukturmodells vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden ca. 30 Auslassungs-Dichten berechnet, wobei jeweils bis zu 10

Aminosäuren ausgelassen und in der anschließenden Differenzdichte überprüft wurden. Durch diese Prozedur konnte in Position 25 ein bis dahin noch nicht sichtbares Tyrosin in die Polypeptidkette eingebaut werden. Weiterhin konnte die Aminosäure-Sequenz im Bereich 180 durch Einschub eines Glycins, und im Bereich 205-209 nach einem Umbau dieser Reste endgültig festgelegt werden (siehe Abb. 11.2). Der C-Terminus des Proteins, der offensichtlich aufgrund höherer Flexibilität schlecht zu interpretieren war, ließ noch keine eindeutige Zuweisung der Seitenketten zu. Durch die Lage der jetzt schon zu erkennenden letzten beiden Tyrosinseitengruppen war jedoch eine Abweichung zur chemisch ermittelten Sequenz deutlich zu erkennen.
Bei der anschließenden Suche nach Lösungsmittelatomen konnten noch weitere 46 OW-Lagen gut bestimmt werden. Ausschlaggebend war neben einer gut definierten Elektronendichte vor allem das Kriterium guter Wasserstoffbrückenbindungs-Abstände zu Protein- oder anderen Lösungsmittelatomen. Neben den OW-Lagen konnte außerdem noch ein Kation, das von 4 Lösungswassern und 2 Proteinseitengruppen koordiniert wird (Abb. 7.9 C), gefunden werden. Dieses Kation wurde in der folgenden Verfeinerung zuerst als Na^+ behandelt.

Stufe 5 :
Den neu lokalisierten OW-Atomen wurde ein Ausgangstemperaturfaktor von 20 $Å^2$ zugewiesen. Alle umgebauten Bereiche der Proteinstruktur wurden im B-Wert auf 10 $Å^2$ zurückgesetzt. Die anschließend ausgeführte Verfeinerung konvergierte nach 19 Zyklen für R bei 18.8 % . Dieser Wert ist schon recht akzeptabel. Oftmals werden Verfeinerungen bei B-Werten unter 20 % als erfolgreich abgeschlossen, obwohl durchaus noch bessere Ergebnisse erzielt werden können, wie die folgenden Ausführungen zeigen .

Nach Durchsicht der Elektronendichteverteilungen konnten noch 63 Wassermoleküle definiert werden. An der Position des Kations zeigte sich in der Differenzdichte immer noch eine starke Elektronendichte. Da auch der Temperaturfaktor der bisher als Na^+ behandelten Atomlage in der vorangehenden Verfeinerung auf den auf 2.0 begrenzten Minimalwert konvergierte, wurde dieses Atom jetzt als Ca^{2+} behandelt. Eine entsprechende Änderung der Streukurven wurde jeweils direkt in der FORTRAN-'Source' des Verfeinerungsprogramms vorgenommen.

Stufe 6 :

In der anschließenden Verfeinerung erreichte der R-Faktor einen Wert von 16.6 % . Aus den jetzt erhaltenen Elektronendichten konnten nun auch die Aminosäuren am C-Terminus des Enzyms endgültig lokalisiert und die Sequenz bis auf die der Seitenkette 278 der Elektronendichte angepaßt werden.
Bei einer Überprüfung der bis dahin verfeinerten OW-Lagen wurden 9 Positionen mit chemisch nicht sinnvollen Temperaturfaktoren von über 60 $Å^2$ aus der Atomliste gestrichen. Da die Besetzungs- und Temperaturfaktoren stark korreliert sind, wurden die Besetzungsfaktoren der Wassermoleküle zu 1.0 festgelegt.

Stufe 7 :

Die Verfeinerung konvergierte bei einer maximalen Auflösung von noch 1.8 Å zu R = 16.1 % . Dieser Wert kann als sehr gut angesehen werden. Bei einer anschließenden Überprüfung der Wasserpositionen wurden nochmals zwei unsichere Lagen aus der Atomliste gestrichen. Eine Durchsicht der Differenz-Elektronendichte zeigte keine signifikante Dichte über 0.35 $e/Å^3$.

Stufe 8 :

Bei der abschließenden Verfeinerung und Idealisierung des jetzt nahezu kompletten Strukturmodells wurden alle vorher eingegebenen Begrenzungen der Wasserstoffbrücken-Kontakte und der beiden S-S Brücken aufgehoben. Zusätzlich wurde die Anzahl der zu einer Ebene begrenzten Hauptkettenatome von 5 (C_α,C,O,N,C_α) auf 4 (C_α,C,O,N) reduziert, um eine weitgehend 'freie' Verfeinerung der Struktur zu erreichen. Zur Verfeinerung wurden jetzt alle Daten bis 1.5 Å Auflösung herangezogen. Dieser Schritt bedurfte einiger Vorarbeit, da die meisten der benutzten Programme für die bei dieser Auflösung vorhandenen großen Datenmengen nicht mehr ausgelegt waren und entsprechend erweitert werden mußten. Insgesamt wurde die Struktur mit 30812 Daten mit $F > 3\sigma(F)$, welche ca. 80 % der insgesamt meßbaren Daten bis 1.5 Å entsprechen, auf einen R-Wert von 16.7 % verfeinert. Hierbei wurde vor allem das Gewicht auf die Parametern der Stereochemie erhöht, um eine gute Idealisierung der Proteinstruktur zu erreichen.
Die Stereo-Abbildungen 6.3.1 und 6.3.2 zeigen am Beispiel des aktiven Zentrums und des Tyrosins 61 die Verbesserung der Elektronendichte und der Auflösung in drei Schritten.
Bild A zeigt jeweils die MIR-Elektronendichte bei einer Auflösung von 2.8 Å, Bild B zeigt die $2F_o - F_c$ Elektronendichte bei einer Auflösung von 2.0 Å nach 20 Zyklen der Verfeinerung.
Bild C zeigt die Elektronendichte am Ende der Verfeinerung bei einer Auflösung von 1.5 Å .
Der Ausschnitt des aktiven Zentrums zeigt in der Mitte jeweils den Imidazolring des HIS 69, links oben das OG des SER 224 und rechts hinter dem HIS 69 die Seitengruppe des ASP 39. In der MIR-Elektronendichte ist die Seitengruppe des Histidins noch nicht mit der Hauptkette verbunden, in der fast atomar aufgelösten Elek-

tronendichte in Bild C sieht man dagegen sogar ein Loch in der Mitte des Imidazolrings.
Abb. 6.3.2 A zeigt die schlecht aufgelöste MIR-Elektronendichte für die Seitengruppe 61 . An dieser Stelle ist auch der Verlauf der Hauptkette noch undeutlich. In Bild C dagegen wird die Interpretation eindeutig. Man erkennt sogar andeutungsweise die H-Atomlagen des C_β-Atoms

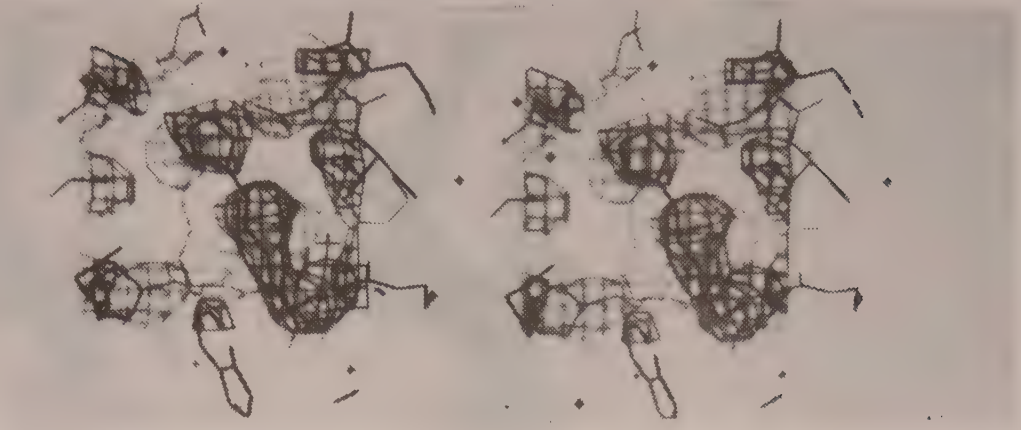
6.2.2 Güte der Verfeinerung

Tabelle 6.2 zeigt die Standardabweichungen der stereochemischen Parameter. Sie wurden nach dem letzten Verfeinerungszyklus aus der inversen Normalmatrix bestimmt und können für eine Struktur dieser Größenordnung als äußerst zufriedenstellend angesehen werden. Nur 7.2 % aller Abstände zwischen nächsten, übernächsten und drittnächsten Nachbarn liegen außerhalb 2 Standardabweichungen zum jeweils zugehörigen Idealwert.
Nur 21 Abstände, entsprechend 0.4 % aller Abstände liegen außerhalb von 4 Standardabweichungen. Die mittlere Koordinatenverschiebung betrug beim letzten Zyklus nur noch 0.011 Å und die mittlere Änderung der Temperaturfaktoren 0.10 $Å^2$.
Eine abschließende Differenz-Fourier Synthese zeigte noch an 20 Stellen Elektronendichten, die über 0.30 $e/Å^3$ lagen. Von diesen ließen sich noch 5 als schwach besetzte Lösungsmittel-Positionen interpretieren. Die restlichen Maxima lagen meist in der Nähe von Serin, Leucin oder Isoleucin Seitengruppen und deuteten eine schwache Fehlordnung dieser Seitenketten an. Die beiden noch fehlenden Seitengruppen von Glutamin 103 und Glutamin 275 ließen sich auch in diesem Stadium nicht einer definierten Elektronendichte anpassen, da offenbar eine starke Fehlordnung vorliegt.

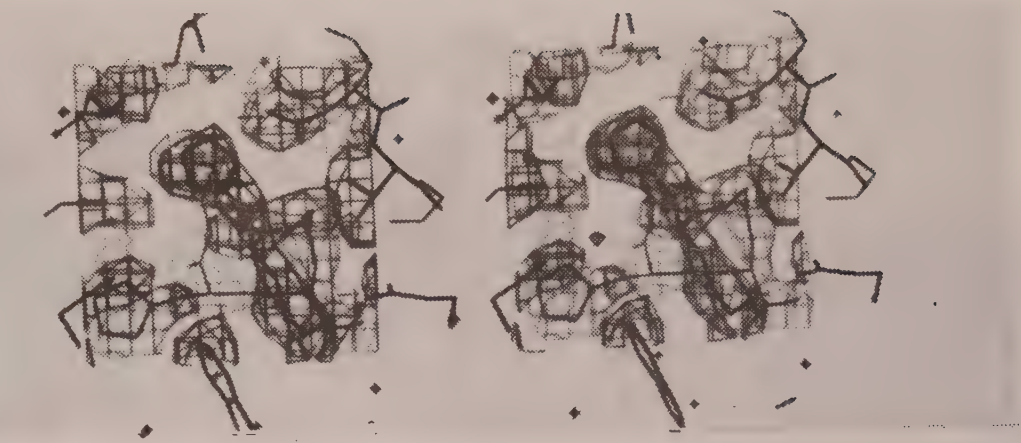
Abb. 6.3.1

Stereo-Abbildungen von Elektronendichten (Legende siehe Text, S 71)

A



B



C

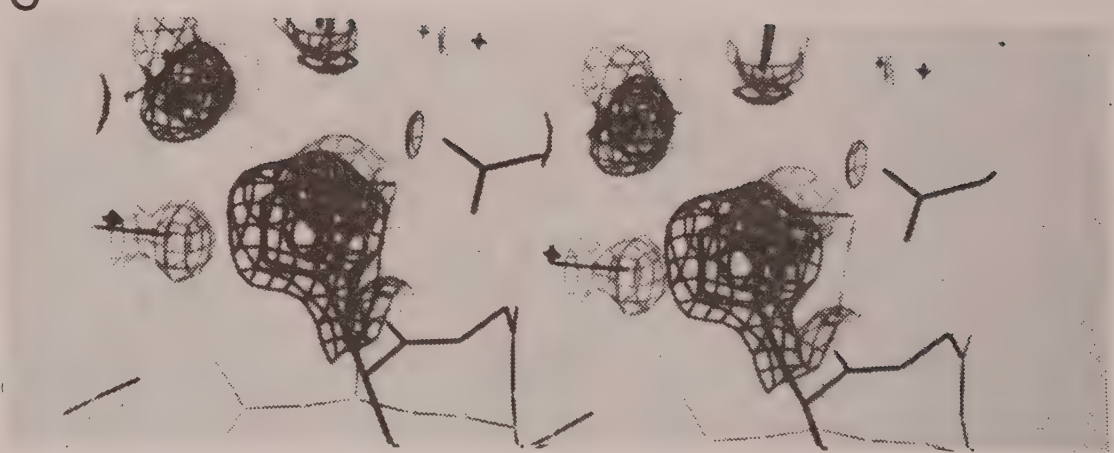
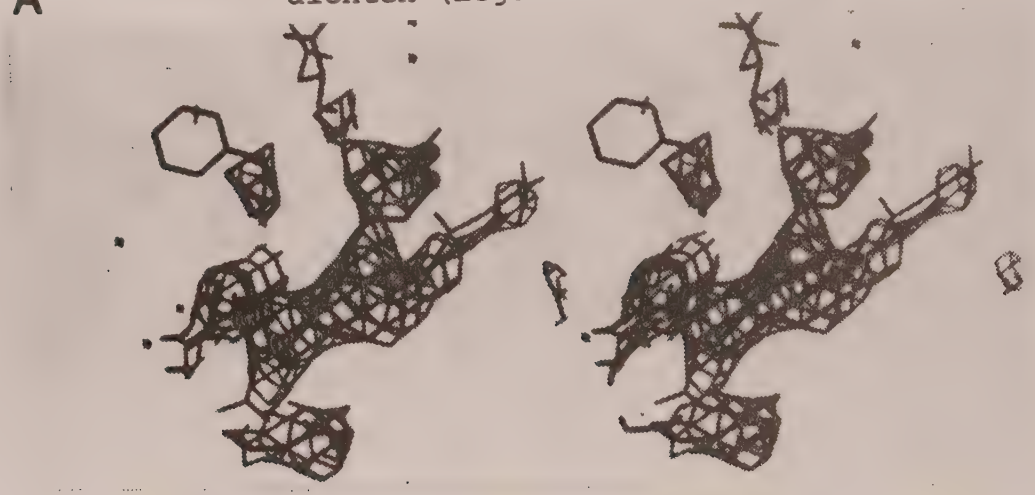
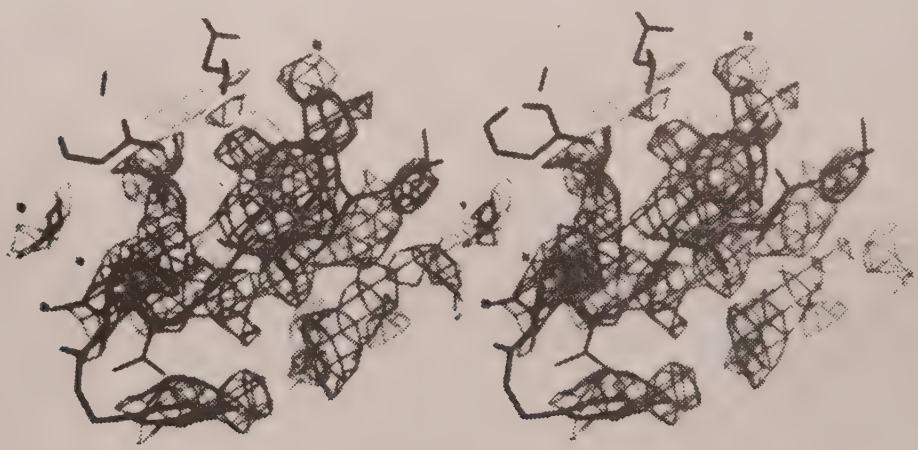


Abb. 6.3.2 Stereo-Abbildungen von Elektronendichten (Legende siehe Text, S 72)

A



B



C

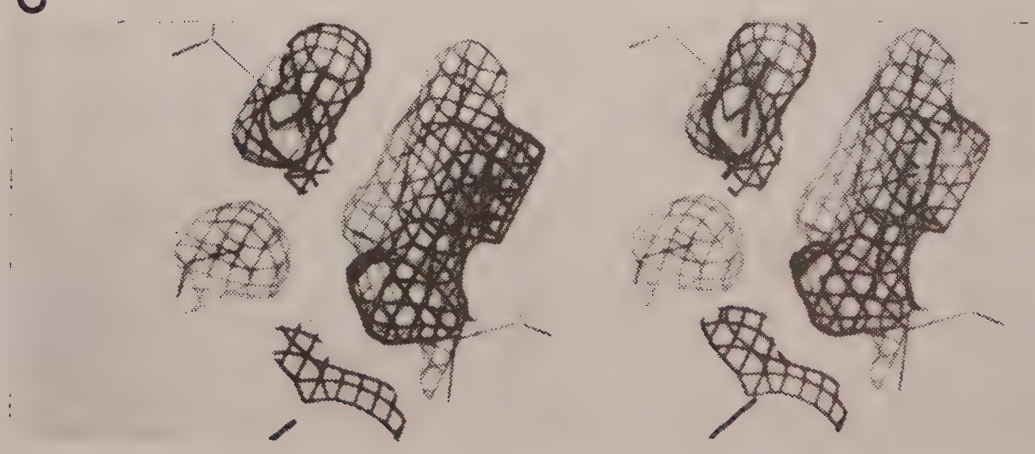


Tabelle 6.1

Stufe	1	2	3	4	5	6	7	8
Anzahl der Zyklen	17	12	22	13	19	7	12	11
Anzahl der Parameter	5753	6101	8133	8133	8469	8829	8797	8773
Anzahl der Reflexe	7369	9647	13697	20427	20427	20427	20427	30812
Anzahl der Atome	1917	2033	2033	2033	2129	2207	2199	2194
davon Lösungsmittel	(0)	(76)	(76)	(76)	(123)	(185)	(176)	(174)
Auflösungsbereich	5.0-2.5	5.0-2.3	5.0-2.0	5.0-1.8	5.0-1.8	5.0-1.8	5.0-1.8	5.0-1.5
Temperaturfaktor in $Å^2$	8.2	8.0	9.3	10.8	11.1	11.6	11.4	11.1
$(\|\|F_o\|-\|F_c\|\|)$	132.5	122.4	90.5	78.0	63.0	57.0	55.2	48.3
R (Anfang)	45.4	41.1	32.1	25.5	30.1	21.9	17.1	18.5
R (Ende)	29.0	29.1	23.1	23.2	18.8	16.6	16.1	16.7
Standardabweichungen von den idealen:								
Bindungslängen (1-2)	0.031	0.030	0.034	0.029	0.023	0.015	0.020	0.015
bezogen auf (1-3)-Abstände	0.111	0.089	0.067	0.060	0.052	0.038	0.041	0.034
Planaren Gruppen (Å)	0.023	0.019	0.024	0.024	0.020	0.021	0.019	0.012
Chiralen Volumen ($Å^3$)	0.37	0.30	0.32	0.28	0.26	0.19	0.19	0.15
Winkel der Peptidebene (ω)	3.9	7.8	5.5	7.0	9.5	7.0	6.3	4.9

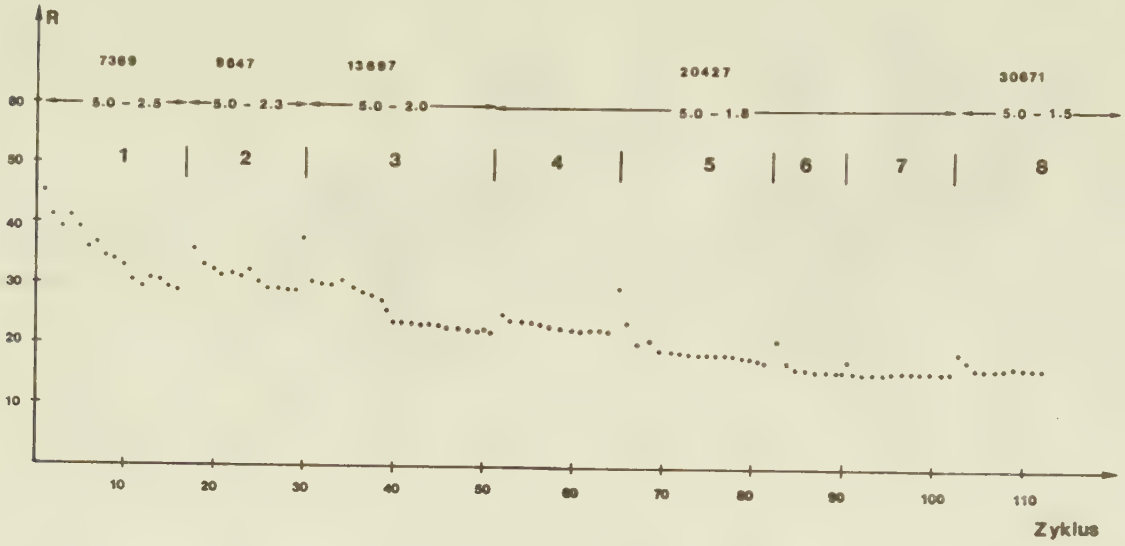


Abb. 6.2 zeigt den Verlauf des R-Faktors im Zuge der Verfeinerung. Die Zahlen über der Kurve geben die Anzahl der Reflexe in den verschiedenen Auflösungsbereichen an. Darunter werden die Bereiche der im folgenden beschriebenen Verfeinerungstufen angegeben.

Eine obere Grenze für den mittleren Koordinatenfehler der Kristallstruktur kann nach Luzatti [99] durch Auftragen des R-Faktors gegen die Auflösung ermittelt werden.

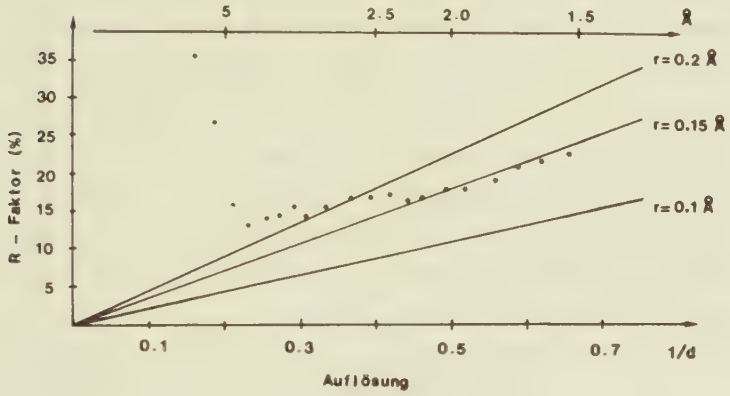


Abb. 6.4 zeigt nach Luzatti die Änderung des endgültigen R-Faktors (in %) in Abhängigkeit von der Auflösung (1/d,Å) und die theoretisch berechneten Geraden für einen mittleren Koordinatenfehler r .

Mit Ausnahme der Werte bei extrem niedriger Auflösung, die aufgrund der Vernachlässigung des ungeordneten Lösungsmittelanteils von den theoretisch berechneten Geraden stark abweichen, lassen sich die Punkte sehr gut der mittleren Geraden , die auf einen Koordinatenfehler von 0.15 Å hindeutet, annähern. Ähnliche Werte wurden auch für andere gut verfeinerte Protein-Kristallstrukturen gefunden [92,100] .

Erstaunlich gut ist die Anpassung bei hoher Auflösung, für die bei den meisten Proteinstrukturen eine merkliche Abweichung zu größeren Fehlern beobachtet wird [101]. Dies spricht ebenfalls für die Güte der hier vorliegenden Verfeinerung.

Ein Vergleich der 266 C_α-Ausgangspostionen [76] mit den 279 C_α-Lagen der verfeinerten Struktur nach der Methode von Argos und Rossmann [103] ergab nach einem Zyklus dieser kleinste-Quadrate-Anpassungsprozedur eine mittlere Abweichung von 1.72 Å für 227 vergleichbare Positionen. Der tatsächliche Unterschied wird aber noch höher liegen, da nach der oben genannten Methode sowohl die verfeinerten als auch die unverfeinerten C_α-Positionen aufeinander angenähert werden. Bemerkenswert ist auch, daß nur 227 der 266 Ausgangslagen dem verfeinerten Modell angepaßt werden konnten. Die restlichen 39 C_α-Positionen lagen außerhalb des mit 8 Å vorgegebenen Abstands-Kriteriums .

Hieraus wird noch einmal die Notwendigkeit einer Hochauflösungs-Strukturverfeinerung zur detaillierten Interpretation der Elektronendichte deutlich. Eine Strukturermittlung, die nur auf der MIR-Elektronendichte beruht, darf daher, wie die obigen Zahlen beweisen, nicht überbewertet werden.

Der Unterschied zwischen den Phasenwinkel ($<\!/\alpha_{MIR} - \alpha_c /\!>$), die aus den verfeinerten Modellkoordinaten berechnet wurden (α_c) und nach der MIR-Methode (α_{MIR}) ermittelt wurden, verringerte sich im 100 Å bis 2.8 Å Auflösungsbereich von einem mittleren Wert von 68° am Anfang zu 44° am Ende der Verfeinerung. Der mittlere Fehler des Phasenwinkels, der sich bei der Phasenwinkelbestimmung aus der sogenannten "figure of merit" von 84.6 % zu 32° ergab, war dadurch um ca. 10° besser eingeschätzt, als die tatsächlichen Ergebnisse erbracht haben. Trotzdem sind die MIR-Phasen offensichtlich recht gut bestimmt worden, da sich die aus den Modellkoordinaten berechneten Phasenwinkel im Laufe der Verfeinerung etwas den MIR-Phasen angenähert haben.

Tabelle 6.2

Gewichtungsschema sowie Ergebnisse und Standardabweichungen nach dem letzten Verfeinerungszyklus

Abstände:	σ *	Standard abweichung	Anzahl Parameter
Bindungslängen (1-2 Nachbarn; (Å)	0.017	0.015	2058
Winkel bezogen (1-3 " ; (Å)	0.027	0.034	2798
Ebenen bezogen (1-4 " ; (Å)	0.037	0.043	753
Planare Gruppen (Å)	0.020	0.012	357
Chirale Volumen ($Å^3$)	0.100	0.146	312
Van der Waals Kontakte:			
einfach Torsionskontakte (Å)	0.400	0.166	714
mehrfach " (Å)	0.400	0.309	907
mögliche Wasserstoff-brücken-Kontakte (Å)	0.400	0.173	232
Torsionswinkel:			
Peptidebene (ω)	2.5	4.9	288
gestaffelte Torsionskontakte (60°/120°)	15.0	18.7	305
orthonormale Torsionskontakte (90°)	20.0	23.1	29
Anzahl der cis-Proline : 1			
Isotrope Temperaturfaktoren:			
Hauptkette (1-2 Nachbarn) ($Å^2$)	1.00	.849	1152
" (1-3 ") ($Å^2$)	1.50	1.234	1456
Seitenkette (1-2 ") ($Å^2$)	1.00	1.452	906
" (1-3 ") ($Å^2$)	1.50	2.195	1344

abschließender R-Faktor im Auflösungsbereich von 5.0 Å - 1.5 Å

Für	30812 Reflexe $> 3\sigma(F)$	R = 16.7 %
	34211 " $> 2\sigma(F)$	R = 17.7 %
	34876 " $> 1\sigma(F)$	R = 18.0 %

*das Gewicht auf jeder Begrenzung (Restraint) entpricht $1/\sigma$.

7. Beschreibung der Molekülstruktur der Proteinase K

7.1 Allgemeiner Aufbau

Die Primärstruktur der Proteinase K setzt sich aus 279 Aminosäuren zusammen. Sie ist schematisch in Abb. 11.2 aufgeführt. Die Faltung dieser Polypeptidkette verleiht dem Enzym eine auf einer Seite abgeflachte, halbkugel-förmige räumliche Gestalt mit einem Durchmesser von ungefähr 40 Å . Das aktive Zentrum liegt in einer leichten, aber deutlich sichtbaren Einbuchtung an der flachen Seite, die jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt ist wie bei den Enzymen der Trypsin-Familie. Das wesentliche Merkmal der in die Strukturklasse der α/β-Proteine [107] einzuordnenden Proteinase K ist die zentrale Helix, an deren N-Terminus sich das aktive Zentrum befindet, und zwei äußere Helices. Die an der katalytischen Aktivität des Enzyms beteiligten Reste sind ASP 39, HIS 69 und SER 224. Zum sekundären Substratbindungsbereich gehören die Aminosäuren 132-135 .

Abbildung 7.1 A zeigt den Verlauf der Polypeptidkette anhand einer Cα-Darstellung mit Blick entlang der zentralen Helix. Die aktiven Reste sind durch einen kleinen Stern gekennzeichnet. Die S-S Brücken sind mit eingezeichnet. N- und C-Terminus der Polypeptidkette sind gekennzeichnet. Bild B ist entsprechend zu A um 90° gedreht, mit Ansicht auf die beiden äußeren Helices.

Bild C zeigt eine Stereoansicht der aus 1117 Atomen bestehenden Hauptkette mit Blick entlang der zentralen Helix. Bild D zeigt eine Stereoansicht in der Orientierung wie Bild B vom ganzen Molekül. Deutlich ist die leichte Einbuchtung am aktiven Zentrum zu erkennen.

Neben der zentralen Helix, die mit 19 Aminosäuren zugleich auch die längste Helix ist, existieren noch 5 weitere α-Helices und zwei,

im allgemeinen weniger häufig beobachtete [105], 3_{10}-Helices. Die α-Helices werden in der folgenden Strukturbeschreibung nach ihrer Folge in der Sequenz mit den Buchstaben A bis F bezeichnet, die 3_{10}-Strukturelemente mit 3_{10} A und 3_{10} B . Der Kern des Moleküls ist weitgehend hydrophoben Charakters und wird von den Seitenketten eines fünfsträngigen parallelen Faltblatts gebildet, an dem sich noch drei weitere leicht verdrillte, einem Faltblatt ähnliche Strukturelemente anknüpfen, die bis zur Peripherie des Moleküls reichen. Weiterhin findet man noch zwei antiparallele Faltblätter jeweils am Anfang und Ende der Polypeptidkette.

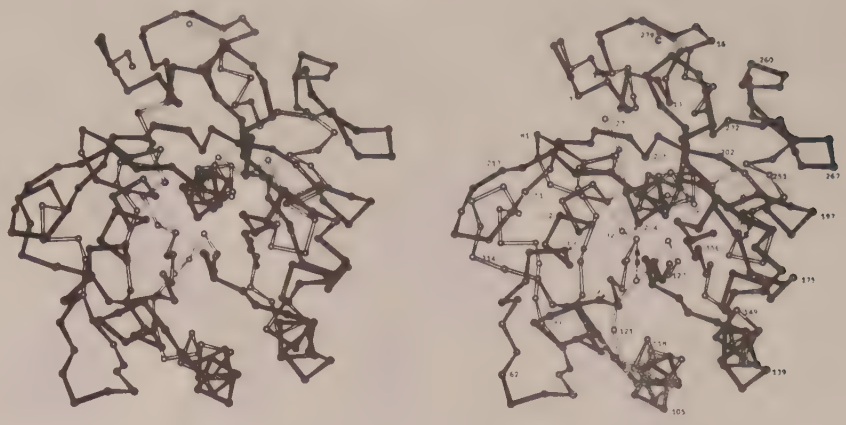
Die zum zentralen Faltblatt gehörenden Bereiche werden mit F_{Z1} - F_{Z8} und die antiparallelen Bereiche am Kettenanfang mit F_1 und am Kettenende mit F_2 bezeichnet. Das antiparallele Faltblatt am Anfang der Polypeptidkette bindet den N-Terminus an das Molekül (Abb. 7.7 C) . Die terminale-NH_3^+-Gruppe wird zusätzlich von der negativ geladenen Seitengruppe der Glutaminsäure 27 über eine Wasserstoffbrücke fixiert. Im gleichen Bereich der Struktur wird auch die Hauptkette des C-Terminus, sowie die Hydroxylgruppe des Tyrosin 277 über einige Wasserstoffbrücken an das Molekül gebunden. Diese besonders ausgeprägte, mehrfache Bindung von N- und C-Terminus am Rumpf des Moleküls ist in dieser Art bisher nur bei der Struktur der Carboxypeptidase A [106] beobachtet worden. Sie hat offensichtlich den Zweck, das Enzym vor Selbstzerstörung zu schützen, da die Stabilität der Gesamtstruktur wahrscheinlich wesentlich erhöht wird.

Zur Charakteristik der Struktur gehören noch sieben sogenannte ß-Biegungen und 2 Disulfidbrücken von Aminosäure 34 nach 123 und 178 nach 249 . Die Geometrie dieser Bindungen ist ähnlich zu der in anderen Proteinen gefundenen Konformation [153] .Die S-S Bindungslängen betragen 1.99 Å und 2.06 Å . Die C-S-S Winkel liegen im Bereich von 101.5° bis 105.2°,die C-S-S-C Torsionswinkel reichen von 90° bis 103° .

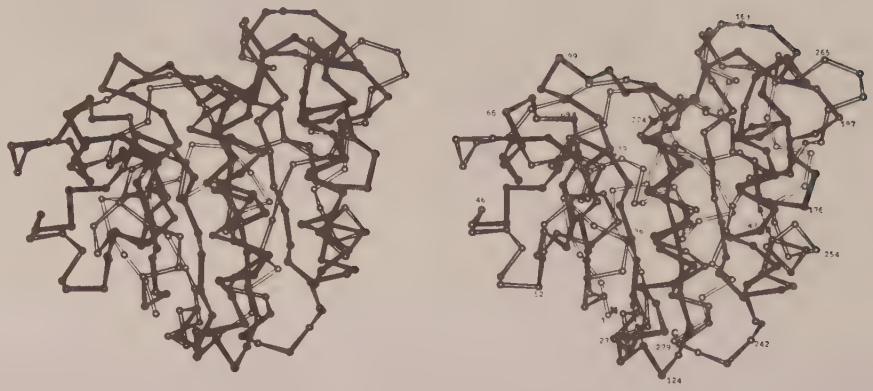
Abb. 7.1

Stereo-Abbildungen der Proteinase K
(Legende siehe Text, S 80)

A

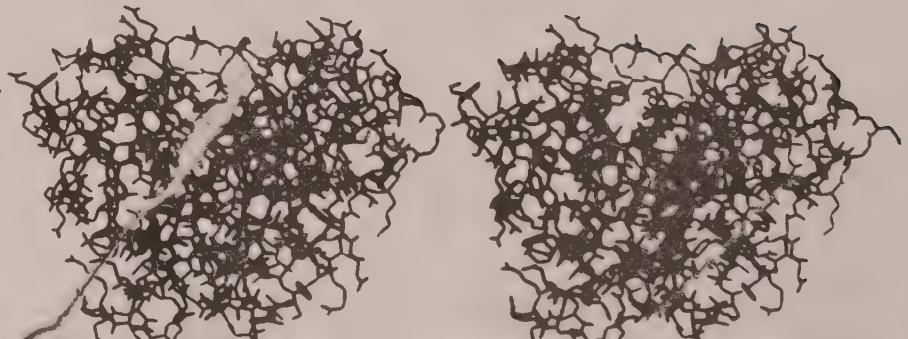


B



C

D



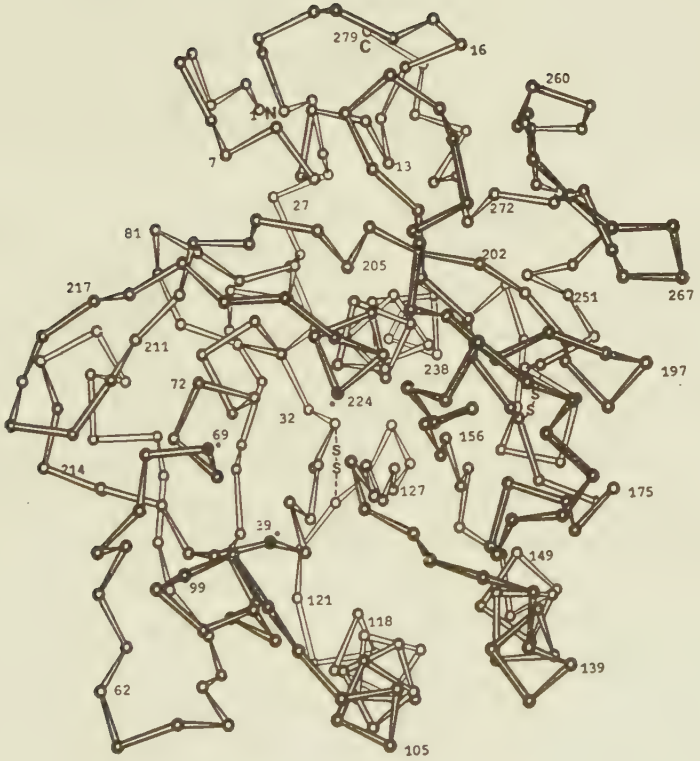


Abb. 7.1 E zeigt in einem größerem Format dieselbe Ansicht wie Abb. 7.1 A

7.1.1 Konformationswinkel der Hauptkette

Die Torsionswinkel Φ und Ψ entlang der Polypeptidkette sind in Tabelle 11.1 aufgelistet und in Abb. 7.2 als Ramachandran-Diagramm aufgetragen. Die aus der Peptidgeometrie folgenden sterisch erlaubten Bereiche für die Torsionswinkel sind nach der Methode von Ramakrisknam und Ramachandran ermittelt [104] und gestrichelt gekennzeichnet angegeben.

Bis auf 20 Glycinaminosäuren, die aufgrund der fehlenden Seitengruppen alle Torsionswinkel außer $\Phi = -20^{\circ}$ bis 20° und $\Psi = -20^{\circ}$ bis 20° annehmen können, liegen fast alle anderen Aminosäuren in den erlaubten Regionen. Im Torsionswinkelbereich für eine linksgängige α- Helix finden sich neben einigen Glycinen die Aminosäuren ASN 5, ASN 163, ASN 276 und GLU 50 . Die für die Konformation dieser Aminosäuren etwas ungünstigen Torsionswinkel werden durch starke Wasserstoffbrücken der polaren Seitengruppen stabilisiert. Eine ähnliche Ansammlung von Aminosäuren in diesem Torsionswinkelbereich ist auch in der Struktur des Enzyms Actinidin beobachtet worden und konnte auch dort durch die starken Wasserstoffbrücken der polaren Seitengruppen erklärt werden [108].

Auffallend sind auch die etwas ungünstigen Torsionswinkel von ASP 39 (gekennzeichnet durch einen Pfeil). Diese Aminosäure gehört zu den aktiven Resten des Katalyse-Mechanismus und liegt am Ende eines Strangs der zentralen Faltblattstruktur.

Der Konformationswinkel ω der Peptidebene hat nach der Mittelung über die ganze Polypeptidkette eine mittlere Abweichung von 4.2° zum Idealwert 180°.

Diese Standardabweichung liegt etwas höher als bei anderen Strukturverfeinerungen beobachtet wird. Sie sollte aber, da die Begrenzungen der Peptidebene am Ende der Verfeinerung von 5 auf 4 Atome

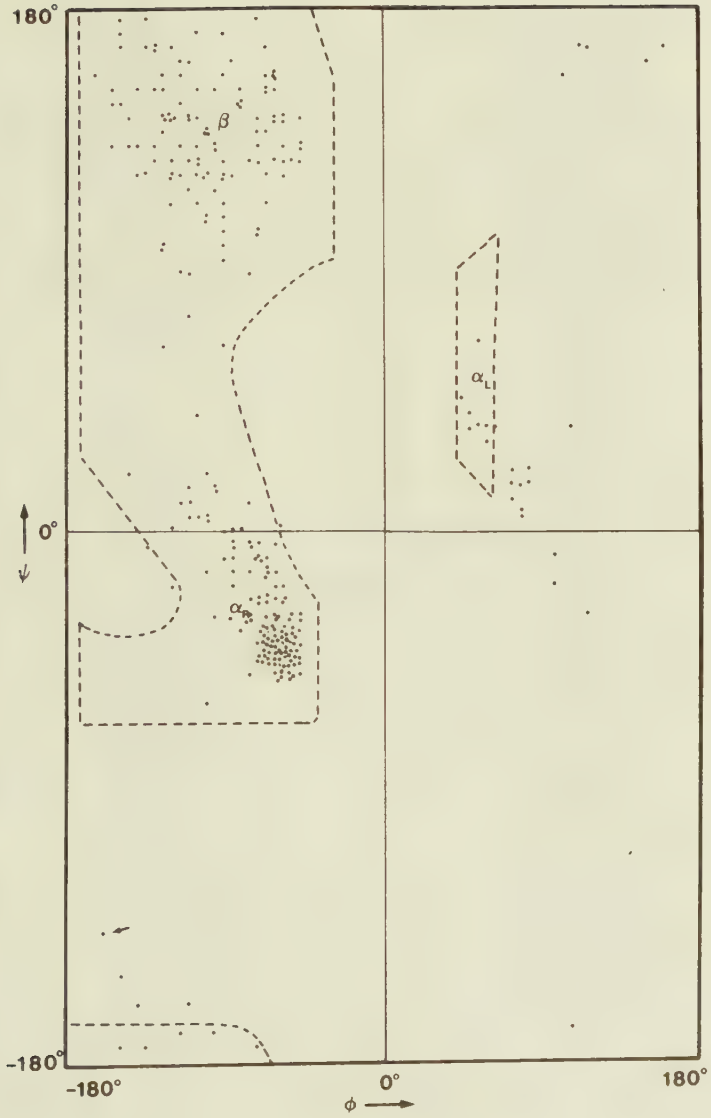


Abb. 7.2 ϕ,ψ Plot für Proteinase K.
Die Torsionswinkelbereiche der α,α_L und β Sekundärstrukturelemente sind entsprechend gekennzeichnet.

verringert wurden, mehr der wirklichen Struktur entsprechen. Prolin 171 liegt am Anfang einer ß-Biegung eindeutig in der cis-Konfiguration vor. Anfängliche Versuche, diesen Rest in der trans-Konfiguration anzupassen, waren, wie die nachfolgende Verfeinerung dann bestätigte, erfolglos. Das Vorkommen von cis-Prolinen ist, wie sich bisher auch an einigen anderen verfeinerten Proteinstrukturen gezeigt hat, nicht mehr ungewöhnlich.

7.1.2 Temperaturfaktoren

Die für Haupt- und Seitenketten gemittelten isotropen Temperaturfaktoren sind in Abb. 7.3 für jede Aminosäure aufgetragen. Der weiche Kurvencharakter dieser Funktion ist auf die während der Verfeinerungsprozedur angewandten Begrenzungen der Temperaturfaktoren zurückzuführen. Die Temperaturfaktoren liegen im Bereich von 5 - 30 $Å^2$ und bis zu 60 $Å^2$ für die Wassermoleküle des Lösungsmittels. Der nach dem letzten Verfeinerungszyklus ermittelte mittlere Temperaturfaktor aller Atome von 11.1 $Å^2$ stimmt sehr gut mit dem aus der Wilson-Statistik ermittelten Wert von 12.2 $Å^2$ überein.

Die im Vergleich zu anderen Proteinstrukturen insgesamt etwas niedrigeren Werte der Temperaturfaktoren sind auf die ungewöhnlich stark ausgeprägte Wasserstoffbrückenvernetzung der Sekundärstrukturelemente und der Seitenketten zurückzuführen. Wie man aus Abbildung 7.3 erkennt, sind die Temperaturfaktoren im Bereich der Helices und Faltblattelemente relativ niedrig, während sie vor allem in den Außenbereichen der Struktur etwas höher liegen.

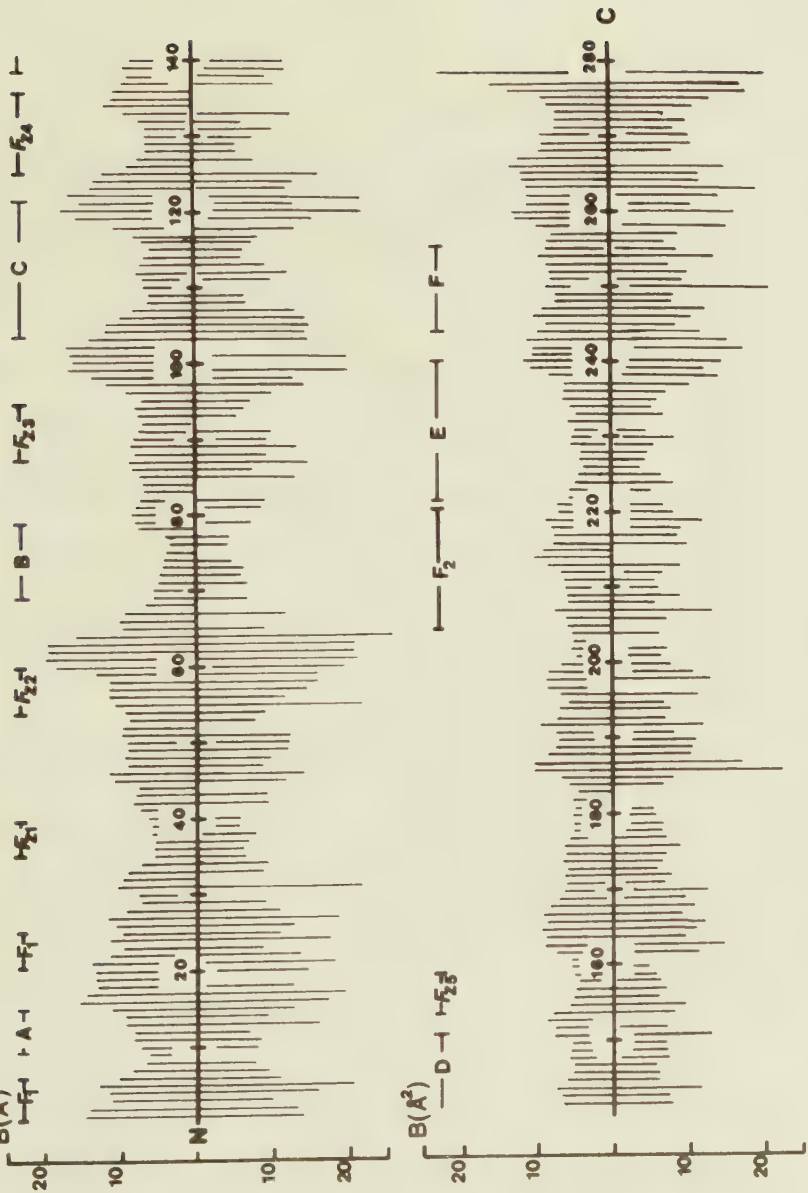


Abb. 7.3 zeigt für alle Aminosäuren die gemittelten Temperaturfaktoren. Sie sind für die Hauptkettenatome oberhalb und für die Seitengruppen unterhalb der Abszisse aufgetragen. Die wichtigsten Sekundärstrukturbereiche sind entsprechend bezeichnet. Die Bereiche des zentralen Faltblatts sind kursiv gekennzeichnet.

7.2 Beschreibung der Sekundärstruktur

Wesentlich für die Stabilisierung der Sekundärstrukturelemente sind die N-H...O-Wasserstoffbrücken innerhalb der Polypeptidkette. Um diese Wasserstoffbrücken besser zu charakterisieren, wurden die Positionen der an Stickstoff gebundenen H-Atome nach der Verfeinerung berechnet. Mögliche Wasserstoffbrücken wurden dann nach dem folgenden Kriterium ausgesucht: maximaler Abstand zwischen Donor und Akzeptor 3.4 Å ;maximaler Abstand zwischen Proton und Akzeptor 2.4 Å ; minimaler N-H...O Bindungswinkel 135° . Um eventuell noch vorhandene Positionsfehler in den Protein-Atomkoordinaten zu berücksichtigen, wurden die oben genannten Bereiche etwas größer gewählt als normalerweise für Wasserstoffbrücken akzeptiert wird [154]. Die Parameter der Wasserstoff-Brücken innerhalb der Hauptkette sind in Tabelle 11.2 A aufgeführt.

Abbildung 7.4 zeigt schematisch den Aufbau der Sekundärstruktur anhand der Wasserstoffbrücken. Der Verlauf der Polypeptidkette wird durch als Punkte dargestellte C_α-Positionen verdeutlicht, die zum größten Teil mit ihrer Sequenznummer versehen sind. Anfang und Ende der Kette sind durch ein eingekreistes N bzw. C symbolisiert. Die Wasserstoff-Brücken sind jeweils durch Pfeile eingezeichnet, die vom Donor zum Akzeptor zeigen. Die Wasserstoffbrücken, die von Seitenketten oder Lösungsmittelatomen (OW-Atomen) zur Hauptkette gebildet werden, sind ebenfalls mit der zugehörigen Atombezeichnung eingetragen. Neben den gut zu-erkennenden Helix- und Faltblattbereichen sind die ß-Biegungen zusätzlich mit einem ß markiert. Die beiden Unterbrechungen innerhalb der Schemazeichnung sind an ihren Verbindungsstellen mit einem eingekreisten A und B gekennzeichnet. Abbildung 7.4

verdeutlicht den ungewöhnlich hohen Anteil an Sekundärstrukturelementen, der im wesentlichen die hohe Stabilität des Proteins erklärt. Insgesamt lassen sich 78% aller Aminosäuren in die klassischen Sekundärstrukturelemente einordnen.

7.2.1 α-Helices

Die Struktur des Enzyms enthält 6 α-Helices und zwei kurze Bereiche, die sich aufgrund ihrer Wasserstoffbrücken und Torsionswinkel als 3_{10}-Helices bezeichnen lassen.
Definiert man die Helixbereiche vom ersten Wasserstoff-Brücken-Donor bis zum letzten Wasserstoff-Brücken-Akzeptor, so sind die α-Helices 9-19 Aminosäuren lang. Anfang und Ende der α-Helices zeigen jeweils leichte Verwindungen zu 3_{10}-Helixstrukturen. Die genauen Parameter der Wasserstoffbrücken in den Helices sind in Tabelle 11.2 A enthalten. Insgesamt liegen 103 Aminosäuren, entsprechend 37% aller Aminosäuren, in helikalen Strukturbereichen. Mit Ausnahme der Helix F sind alle α-Helices mit einer Abweichung von + 15° zueinander parallel. Sie verlaufen außerdem nahezu parallel zur Richtung des zentralen Faltblatts. Diese weitgehend parallele Anordnung der Helix- und Faltblattstrukturbereiche gehört, wie in einer Untersuchung über die Anordnung von Sekundärstrukturelementen ermittelt wurde [67], zu den energetisch günstigen Konfigurationen.
Durch die strenge Ausrichtung der N-H...O - Wasserstoffbrücken stellt eine α-Helix einen Dipol mit der positiven Seite am N-Terminus dar. Abbildung 7.5 zeigt, daß zwei der aktiven Reste der Proteinase K jeweils am N-Terminus der Helices B und E liegen. Die Lage von aktiven Resten am Ende von Sekundärstrukturelementen ist auch bei anderen Proteinstrukturen beobachtet und anhand von

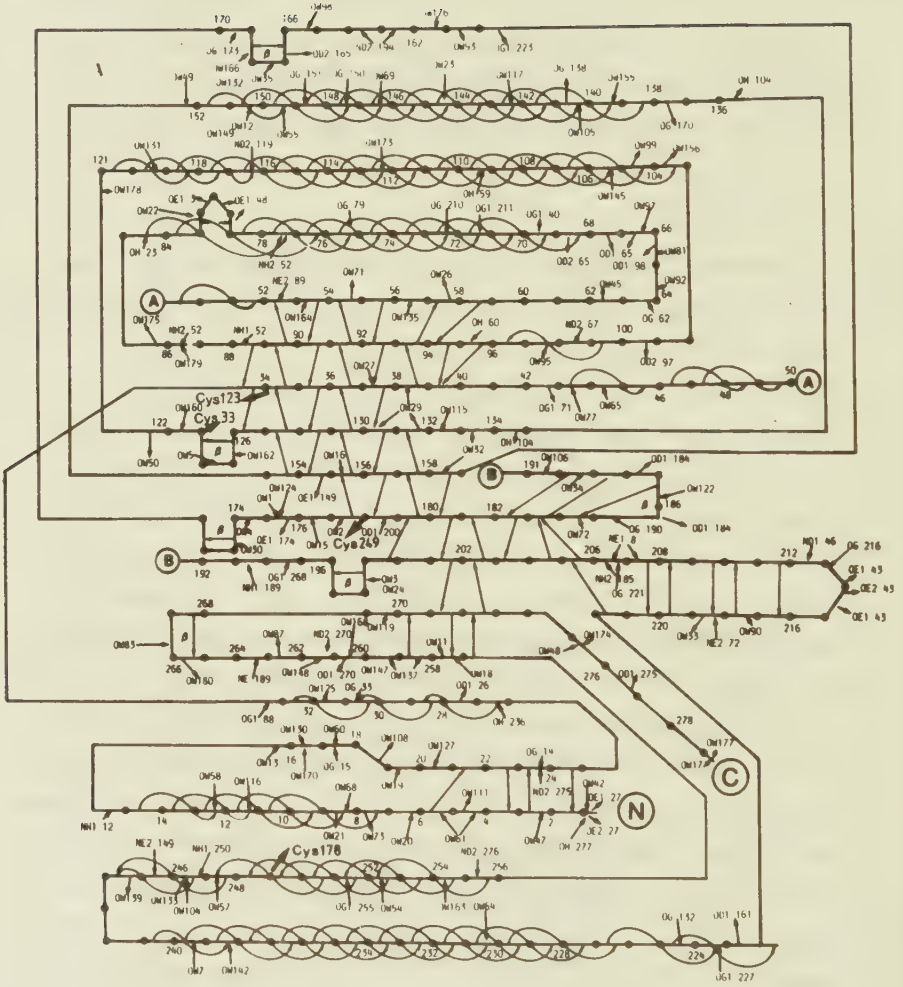


Abb. 7.4 Schemazeichnung der Sekundärstruktur und der Wasserstoffbrücken (Legende siehe Text, Absch. 7.2) .

Modellrechnungen diskutiert worden [110]. Der Effekt der Helix-Dipole auf den Katalyse-Mechanismus konnte bisher jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden. Vermutungen über die Auswirkungen des durch den Dipol erzeugten elektrischen Feldes erstrecken sich hierbei von der Erkennung und Bindung des Substrats bis hin zur Erhöhung der Katalyserate [111,112].

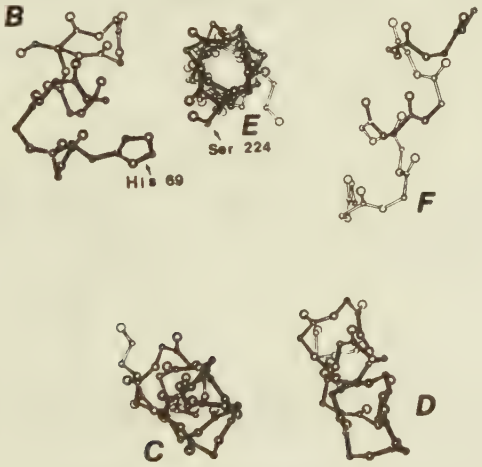


Abb. 7.5 zeigt mit Ausnahme der Helix A und den 3_{10}-Struktur-elementen die Hauptketten der α-Helices mit Blick entlang der zentralen Helix E. Mit eingezeichnet sind die im aktiven Zentrum liegenden Reste HIS 69 und SER 224.

Prolin wird in der Literatur als ´Helixbrecher´ bezeichnet. Es ist deshalb erstaunlich, daß Prolin 228 in der ersten Windung der zentralen Helix E kurz unterhalb des aktiven Zentrums vorkommt. Das Prolin bewirkt dort eine Aufweitung der Helixwindung und führt zu einer Unterbrechung der Wasserstoffbrückenstruktur innerhalb der Helix. Interessant ist, daß in anderen bisher untersuchten Enzymen der Subtilisin-Familie ebenfalls an der gleichen Stelle der Sequenz ein Prolin gefunden wurde [109] (siehe auch Abb. 8.2). Neben den

Subtilisinen und Proteinase K ist dagegen bisher nur in der Struktur von Ferricytochrome c' [101] ein Prolin in einer Helix gefunden worden.

Ein weiteres ungewöhnliches Strukturmerkmal in Proteinase K ist die Unterbrechung am Ende der Helix B, bei der sich nach einer aus 4 Aminosäuren bestehenden Schlaufe neben der Helix wieder eine Windung mit idealer Helixgeometrie und Wasserstoffbrückenstruktur anschließt.

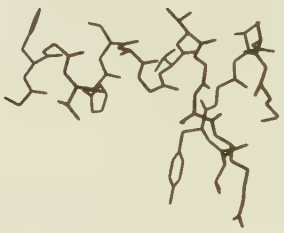


Abb. 7.6 zeigt diesen Ausschnitt (siehe auch Abb. 7.4), mit der im Bild nach unten ausgebildeten Schleife.

In Tabelle 7.1 sind die Mittelwerte für Φ und Ψ der α-Helices angegeben. Nicht berücksichtigt wurden dabei die Torsionswinkel an den Enden der Helices.

Es ergeben sich Mittelwerte von -65° bzw. -39°, die auch ähnlich in anderen verfeinerten Proteinstrukturen gefunden wurden [108].

Tabelle 7.1

Helix-Bez.	Bereich	Länge	Φ(°)	Ψ(°)
A	7 - 15	9	-60(7)	-40(3)
B	68 - 78	11	-61(5)	-43(6)
C	103 - 121	18	-65(9)	-39(7)
D	138 - 152	15	-64(6)	-40(8)
E	222 - 240	19	-65(7)	-38(9)
F	244 - 256	13	-72(18)	-34(16)

7.2.2 Faltblätter und ß-Biegungen

In Proteinase K bilden annähernd 30 % der Hauptkette Faltblattstrukturelemente. Darunter fallen das fünfsträngige parallele Faltblatt im Kern des Moleküls mit drei daran anschließenden kurzen, parallel verlaufenden Faltblattelementen.
Interessant ist auch hier, daß das aktive ASP 39 am Ende eines Faltblattstrangs liegt. Damit liegen alle drei aktiven Reste am N-Terminus von Sekundärstrukturelementen.
Zwei antiparallel verlaufende Faltblattstrukturen liegen jeweils am Anfang und im letzten Viertel der Polypeptidkette.

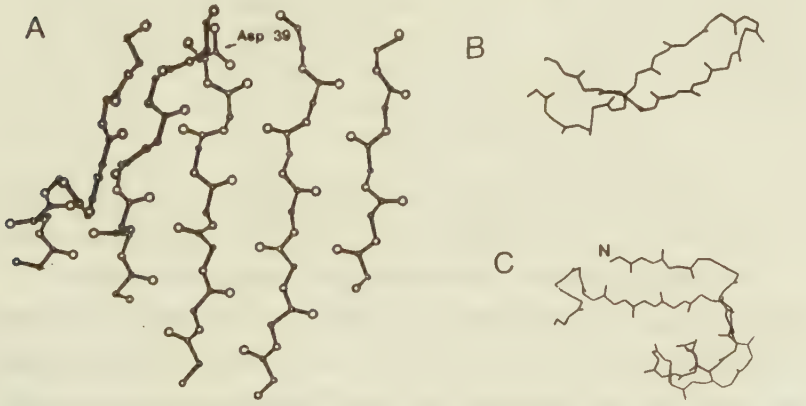


Abb. 7.7 Bild A zeigt das parallel verlaufende zentrale fünfsträngige Faltblatt. Bild B zeigt das antiparallele Faltblatt am Ende der Polypeptidkette. Bild C zeigt das kurze antiparallele Faltblatt am N-Terminus des Proteins.

Die Parameter der Wasserstoffbrücken innerhalb der Faltblattstrukturen sind in Tabelle 11.2 A mit aufgeführt.

Tabelle 7.2 Faltblattstruktur

Bez.	Typ	Bereich
F_{z1}	⇈	35 - 39
F_{z2}	"	54 - 59
F_{z3}	"	87 - 96
F_{z4}	"	125 - 137
F_{z5}	"	154 - 159
F_{z6}	"	177 - 181
F_{z7}	"	200 - 206
F_{z8}	"	271 - 273
F_1	⇅	1 - 6
F_1	"	21 - 25
F_2	"	202 - 211
F_2	"	216 - 221

Die Mittelwerte der Torsionswinkel Φ und Ψ des zentralen Faltblatts sind $\langle\Phi\rangle = -114^\circ$ und $\langle\Psi\rangle = 132^\circ$. Sie sind wieder ähnlich zu den in anderen verfeinerten Proteinstrukturen gefundenen Werten [108].

Neben den 3_{10}-Strukturelementen enthält die Struktur noch 7 sogenannte ß-Biegungen. Sie treten bevorzugt in Schleifen der Polypeptidkette an der Oberfläche des Moleküls oder beim Übergang von aufeinanderfolgenden Sekundärstrukturelementen auf. Sie zeichnen sich durch Wasserstoffbrücken vom Typ Ni+3-H....Oi aus.

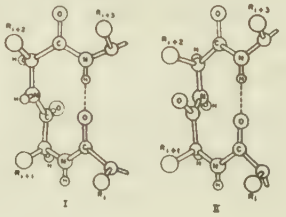


Abb. 7.8 zeigt die geometrische Anordnung der ß-Biegungen des Typs I und Typ II .

Durch die sterische Behinderung zwischen der Seitenkette Ri+2 und dem Carbonylsauerstoff Oi+1 bildet sich der Typ II der ß-Biegung nur mit einem Glycin in der Position i+2 . Die Parameter der Wasserstoffbrücken in ß-Biegungen sind wieder in Tabelle 11.2 A aufgeführt, die geometrischen Parameter sind in Tabelle 7.3 enthalten und entsprechen nahezu den für diese Strukturelemente erwarteten Idealwerten.

Tabelle 7.3

Bereich	Sequenz	Typ	Φ_2	Ψ_2(°)	Φ_3	Ψ_3(°)
123 - 126	Cys-Pro-Lys-Gly	I	-51 ;	-34 /	-90 ;	-4
166 - 169	Ala-Arg-Asn-Tyr	I	-62 ;	-19 /	-98 ;	13
171 - 174	Pro-Ala-Ser-Glu	I	-50 ;	-39 /	-79 ;	-5
184 - 187	Asp-Arg-Tyr-Asp	I	-52 ;	-31 /	-102 ;	16
190 - 193	Ser-Ser-Phe-Ser	I	-62 ;	-25 /	-93 ;	-8
196 - 199	Gly-Ser-Val-Leu	I	-65 ;	-20 /	-79 ;	-16
265 - 268	Pro-Phe-Gly-Thr	II	-53 ;	132 /	101 ;	-11

7.3 Wasserstoffbrückenbindungen der Seitenketten

Die von den Seitenketten ausgebildeten Wasserstoffbrücken erstrecken sich auf Kontakte zu Lösungsmittelatomen, anderen Seitenketten und zu Hauptkettenatomen. Auffällig ist die hohe Anzahl der Hauptkettenkontakte, die durch Wasserstoffbrücken von gegenüberliegenden Seitenketten zur eigenen Hauptkette entstehen. Von diesen Seitenketten- zu Hauptketten-Wasserstoffbrücken bilden drei intermolekulare Kontakte zu Nachbarmolekülen.
Sie werden alle drei jeweils von der Seitengruppe der Argenine 121, 188, 218 zu den Carbonylsauerstoffen O 279, O 241 und O 167 gebildet. Die Abstände sind in Tabelle 11.2 B aufgeführt.
Bei den Wasserstoffbrücken zwischen Seitenketten findet man vier direkte intermolekulare Kontakte, wovon zwei durch sogenannte Salzbrücken zwischen negativ und positiv geladenen Seitengruppen von

ASN 163 nach ASP 254 und ASN 168 nach ARG 218 gebildet werden. Die beiden anderen werden jeweils von der Hydroxylgruppe des TYR 24 zum Seitenkettensauerstoff des ASN 122 und von TYR 61 zum Seitenkettensauerstoff des GLU 3 ausgebildet.
Daneben findet man eine große Anzahl von Wasserstoffbrücken-Kontakten zu Lösungsmittelmolekülen. Insgesamt stellt man fest, daß außer den hydrophoben Seitengruppen kaum Seitengruppen vorhanden sind, die nicht in mindestens eine Wasserstoffbrücke mit einbezogen sind. Offensichtlich ist die Natur bestrebt, ein möglichst intensives H-Brücken-Netzwerk auszubilden, das dann in der Summe seiner Wechselwirkungen wesentlich zur Stabilität der Makromoleküle beiträgt.

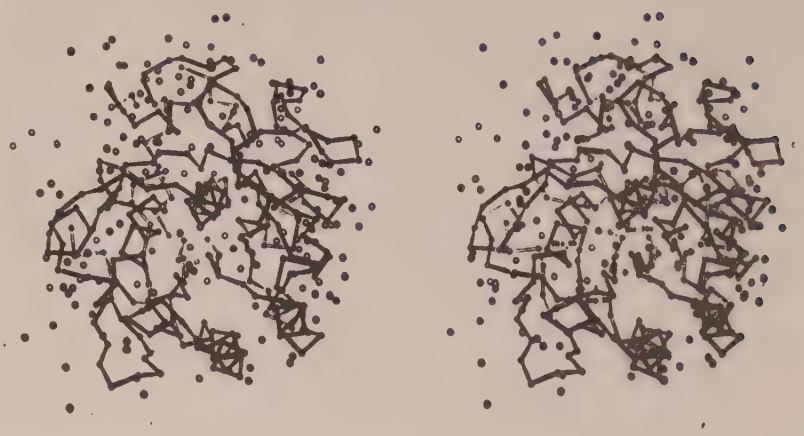
7.4 Lösungsmittel und Zwischenmolekulare Kontakte

Insgesamt konnten während der Verfeinerung 180 Wassermoleküle und ein Ca^{2+}-Ion lokalisiert werden. Die B-Werte der Wassermoleküle liegen im Bereich von 5 bis 60 $Å^2$. Der größte Teil der Wassermoleküle hat B-Werte im Bereich zwischen 15 und 25 $Å^2$ und liegt an der Oberfläche des Proteins. Die am besten lokalisierten Wassermoleküle findet man im Innern des Proteins und in einigen Mulden und Spalten an der Enzym-Oberfläche . 12 Wasserlagen sind offensichtlich partiell besetzt und zeichnen sich durch unrealistisch kurze Abstände untereinander aus, die eine gleichzeitige Anwesenheit verbieten.
Abbildung 7.9 A zeigt die Anordung der Wassermoleküle um das Protein in einer Stereoansicht des C_α-Diagramm mit Blick entlang der zentralen Helix. Die Lösungsmittelmoleküle sind als Kreise eingezeichnet. Die Lage und Bezeichnung der Aminosäuren im aktiven Zentrum ist mit angegeben.

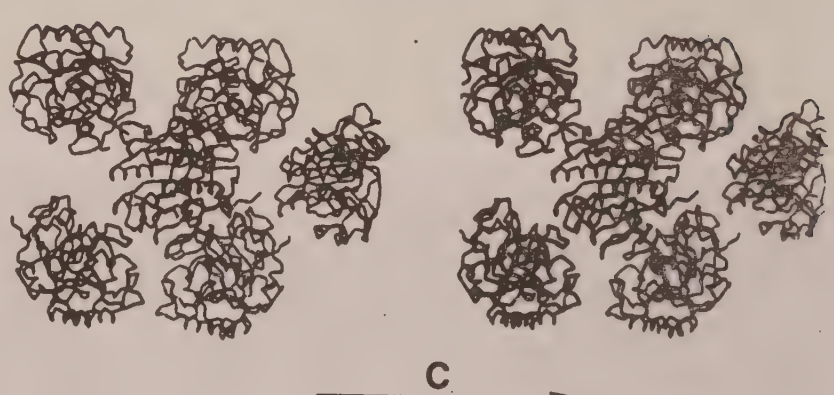
Die Wassermoleküle bilden bevorzugt Ketten bestehend aus 3 bis 6 Molekülen entlang der Oberfläche des Proteins. Weiter bilden sich bevorzugt aus 4 bis 5 Molekülen bestehende "Cluster" aus, in deren Wasserstoffbrückenvernetzung auch teilweise Sauerstoff- und Stickstoffatome der Proteinhauptkette und vor allem auch die Seitengruppen an der Oberfläche des Proteins miteinbezogen werden.
Eine ausführliche Interpretation der Wasserstoffbrückenstruktur würde den Rahmen dieser Arbeit bei weitem überschreiten. Eine solche Untersuchung stellt in ihrem ganzen Umfang eine eigenständige Arbeit dar und ist für die Zukunft in Verbindung mit einer Neutronenbeugungsstudie geplant.
Die Wassermoleküle, die mit der Hauptkette in Kontakt stehen, sind in Abb. 7.4 mit eingezeichnet. Hierbei sind auch die 13 internen Wassermoleküle. Die Wasserstoffbrückenbindungsabstände der Lösungsmittelatome sind in Tabelle 11.2 C und 11.2 D angegeben.
Intensive Wasserstoffbrückenvernetzung mit dem Lösungsmittel findet man vor allem auch zwischen den Molekülen im Kristall. Ihre Positionen sind zum größten Teil auf die Kristallpackung zurückzuführen. Ihre Wasserstoffbrücken tragen wesentlich zur Stabilität der Packung im Kristall bei. Abb. 7.9 B zeigt in einer Stereoansicht die Molekülpackung in der Kristallstruktur anhand von 6 symmetrieverwandten Molekülen. Die einzelnen Moleküle sind mit ihrer zentralen Helix nahezu ideal in Richtung der kristallographischen C-Achse orientiert. Deutlich wird, daß das aktive Zentrum völlig frei und nicht in der unmittelbaren Nähe von Nachbarmolekülen liegt. Diese Packung mit den weiten Lösungsmittelkanälen ist eine gute Vorraussetzung für kristallographische Inhibitorstudien, wie sie in Abschnitt 9 beschrieben werden.
Abb. 7.9 C zeigt die Koordination des Ca^{2+}-Ions anhand einer Dif-

Abb. 7.9 zur Legende siehe Abschnitt 7.4

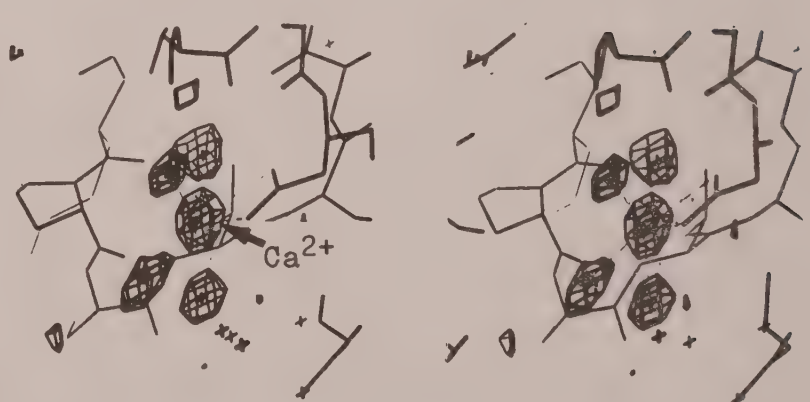
A Proteinase K mit den umgebenden Wassermolekülen



B Kristallpackung der Proteinase K



C Differenz-Elektronendichte des Ca^{2+} Ions und der umgebenden Wassermoleküle



ferenz-Elektronendichte. Das Ca^{2+}-Ion liegt in einer leichten Mulde an der Oberfläche des Moleküls. Es wird im wesentlichen durch die negativ geladene Seitengruppe der Asparaginsäure 200 gebunden und von 4 Wassermolekülen sowie zwei Carbonylsauerstoffen der Hauptkette koordiniert. Die Abstände zu den umliegenden Sauerstoffatomen sind am Ende von Tabelle 11.2 D angegeben. Beim Vergleich zu den zur Phasenwinkelbestimmung benutzten Schweratomlagen stellt man aufgrund der Abstände einen Zusammenhang zur Position des Sm-Derivates mit der Ca^{2+}-Position fest. Da Sm und Ca annähernd gleiche chemische Eigenschaften haben, kann man davon ausgehen, daß diese Lage am Enzym eine bevorzugte Schweratombindungsstelle ist.
In der kürzlich veröffentlichten Inhibitorstudie eines Subtilisin-Eglin Komplexes [151] wird ohne Angabe der genauen Position ebenfalls die Bindung eines Ca^{2+}-Ions erwähnt.

7.5 Das aktive Zentrum

7.5.1 Katalyse-Mechanismus der Serin-Proteasen

Von D. Blow wurde nach der Strukturaufklärung von Chymotrypsin die für die Katalyse verantwortliche, besondere Konstellation von ASP, HIS und SER Seitenketten im aktiven Zentrum der Serin-Proteasen entdeckt und anhand der räumlichen Anordnung dieser Aminosäuren das sogenannte ´Charge-Relay-System´ für den Mechanismus der Serin-Proteasen postuliert [5,6].
Hierbei wird nach Bildung des Michaelis-Komplexes zwischen Substrat und Enzym der Carbonylkohlenstoff der zu trennenden Bindung vom nucleophilen OG des aktiven Serin angegriffen. Das OG wird vorher durch Abgabe seines Hydroxylwasserstoffs an das NE2-Atom des Histidin-Imidazolrings aktiviert. Bei diesem Schritt sollte auch, wie früher vermutet wurde, das H-Atom von NE1 an die

geladene Seitengruppe der Asparaginsäure abgegeben werden, so daß man insgesamt von einer Ladungsverschiebung ausgehen konnte. In einem Zwischenzustand bildet sich dann eine kovalente Bindung zwischen dem OG des Serin und dem Carbonylkohlenstoff des Substrats, so daß dieses dann tetraedrisch koordiniert ist. Dieser Zwischenzustand wird durch die Wasserstoffbrücken zwischem dem Substrat-Carbonylsauerstoff und dem NH-Peptidstickstoff des aktiven Serins sowie einer weiteren Seitengruppe, meist von einem Asparagin, in der Oxyanion-Tasche ('Oxyanion Hole') [114] stabilisiert (siehe auch Abb. 9.3) . In der zweiten Hälfte der Katalyse diffundiert die 'Amidseite' des hydrolysierten Substrats aus dem aktiven Zentrum und wird durch ein Wassermolekül ersetzt. Analog zum ersten Schritt der Katalyse wird nun dem Wasser ein Proton entzogen, wonach die dadurch entstehende OH-Gruppe dann den Carbonylkohlenstoff des Substrats angreift. Das OG kann nun wieder ein Proton vom NE2 des Histidin 'übernehmen', so daß nach Wegdiffundierung des letzten Substratteils das native Enzym wieder vorliegt.
Welche Aminosäure die treibende Kraft des Katalyse Mechanismus ist, wurde lange Zeit gegensätzlich diskutiert. Versuche, diese Frage mit indirekten Methoden, wie NMR-Spektroskopie und quatenmechanischen Berechnungen zu lösen, führten anfänglich zu unterschiedlichen Ergebnissen [115-118]. Klärung brachte erst die kristallographische Neutronenstudie eines Trypsin-Inhibitor-Komplexes [119,120], bei der sich die H-Atompositionen ermitteln ließen. Es zeigte sich, daß während des katalytischen Zwischenzustandes zwei Wasserstoffatome am Imidazolring des Histidins gebunden sind.
Die ursprünglich mit dem 'Charge-Relay-Sytem' verbundene Vermutung, daß während der Katalyse ein Proton über das Histidin zur Seitengruppe der Asparaginsäure übertragen wird, womit die Asparaginsäure zur treibenden Kraft wird, konnte damit verworfen werden.

Eine Überprüfung aller vorangehenden Arbeiten führte schließlich zu dem heute allgemein anerkannten Ergebnis, daß das Histidin die Ausgangsbasis der Katalyse ist und die Funktion der Asparaginsäure sich auf die der räumlichen Orientierung der Histidinseitengruppe beschränkt. Zusätzlich führt die negativ geladene Seitengruppe der Asparaginsäure zu einer Polarisierung des Histidins, die dann die Übertragung des Protons vom OG des Serin zum NE2 des Histidin erleichtert.

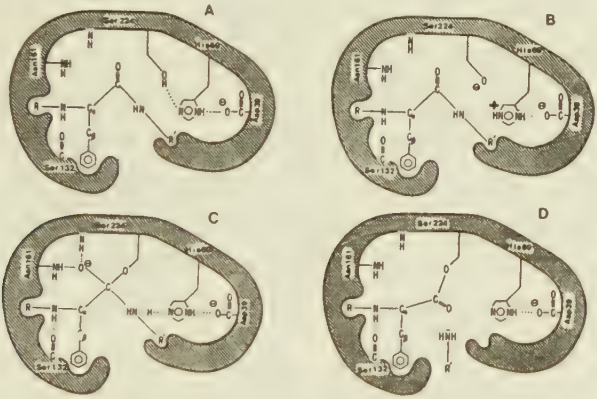


Abb. 7.10 zeigt schematisch die Schritte der Katalyse von Proteinase K . Die Substratreste P2-P4 werden durch R symbolisiert, die Reste P1′ und P2′ durch R′. Bild A zeigt den Michaelis-Komplex, B das aktivierte Katalyse-System nach Übertragung des Protons vom OG des Serins zum NE2 des Histidins. Bild C zeigt den tetraedrischen Zwischenzustand, bei dem ein Proton zur Amidgruppe des, wie im Bild D gezeigten, ausdiffundierenden Produkts übertragen wird. Der Acyl-Zwischenzustand wird danach durch Einbeziehung eines Wassermoleküls auf den des freien Enzyms zurückgeführt.

7.5.2 Geometrie des aktiven Zentrums von Proteinase K

Die verfeinerte Struktur der Proteinase K zeigt, daß die räumliche Anordnung der aktiven Gruppen und die Ausbildung der Wasserstoffbrücken im aktiven Zentrum sehr ähnlich zu den bisher untersuchten Serin-Proteasen ist.

Die bei Proteinase K deutlich vorhandene Wasserstoffbrücke zwischen dem OG des Serin und dem NE2 des Histidin wurde bei den Kristallstrukturuntersuchungen des Subtilsin BPN und Subtilisin NOVO nicht oder nur sehr schwach vorgefunden und führte zwischenzeitlich zu einer widersprüchlichen Diskussion über die Bildung des ´Charge-Relay-Systems´ [122]. Heute kann man jedoch davon ausgehen, daß die Bildung dieser Wasserstoffbrücke allein vom pH-Wert der Enzym-Umgebung bzw. des Lösungsmittels und damit vom Protonierungszustand des Histidin-NE2-Stickstoffs abhängt.

Ebenso war auch lange Zeit nicht deutlich, ob die Wasserstoffbrücke zwischen den aktiven Aminosäuren Histidin und Asparaginsäure gegabelt (´bifurcated´) zwischen OD1 und OD2 oder nur nach OD2 ausgebildet war. Die Hochauflösungsstrukturanalyse der Proteinase K zeigt hier deutlich, daß die Seitenkette des ASP 39 zum Imidazolring des Histidin leicht gekippt ist und nur OD2 eine Wasserstoffbrücke zum Histidin bildet.

Die Seitengruppe des ASN 161 zeigt im nativen Zustand eine Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül, welches außerdem eine H-Brücke zum aktiven Serin 224 OG bildet (siehe Abb. 7.11).

Alle drei aktiven Reste liegen, wie schon vorher erwähnt, am Ende von Sekundärstrukturelementen. Histidin und Serin liegen jeweils am N-Terminus einer Helix und stehen möglicherweise unter dem Einfluß des Helix-Dipols, der am N-Terminus einer halben positiven Ladung entspricht [111]. Der Einfluß solcher Ladungen auf den Katalyse-Mechanismus ist zur Zeit jedoch noch nicht geklärt [110]. Sicher ist dagegen, daß die Anordnung der aktiven Reste auf relativ starren Sekundärstrukturelementen zur geometrischen Stabilität des aktiven Zentrums beiträgt.

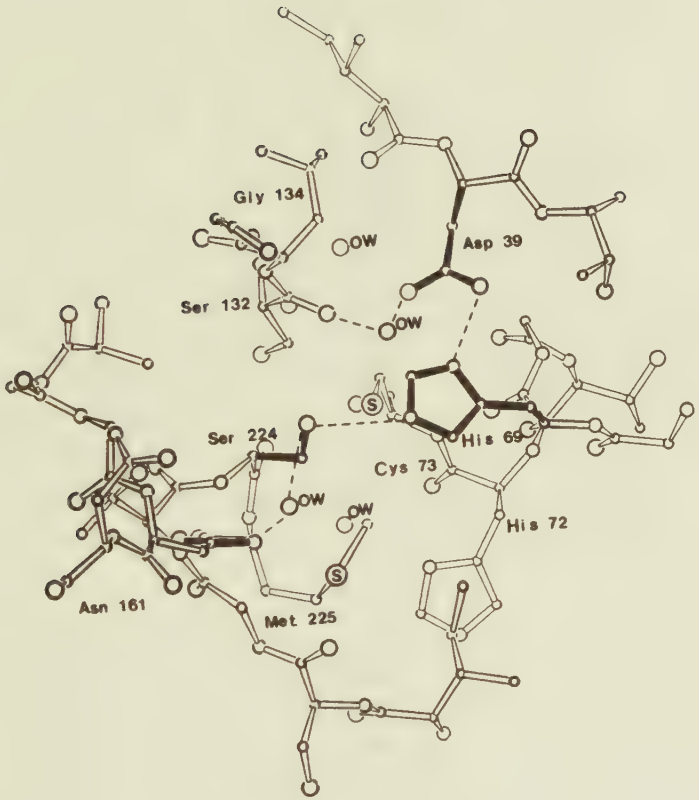


Abb. **7.11** zeigt das aktive Zentrum der Proteinase K und den sekundären Substratbindungsbereich Ser 132 - Gly 134 . Die am aktiven Mechanismus beteiligten Seitengruppen sind schwarz ausgezeichnet. Die Wasserstoffbrücken sind gestrichelt eingezeichnet. Die SH-Gruppe des Cys 73 und der Schwefel des Met 225 sind mit einem S markiert. Die Wassermoleküle im und um das aktive Zentrum sind mit OW gekennzeichnet.

Tabelle 7.4

Wasserstoffbrückenabstände im aktiven Zentrum

Atom			Atom		Abstand (Å)
OG	224	-	NE2	69	3.01
ND1	69	-	OD2	39	2.68
OD1	39	-	OW29		2.63
ND2	161	-	OW36		2.73
OW36		-	OG	224	2.86
OW36		-	OW172		2.78

Der Einfluß eines zweiten Serins, des Serin 33 in der Subtilisin BPN-Struktur und des Serin 214 in der Struktur des Chymotrypsin, auf den Katalyse-Mechanismus wurde ebenfalls einige Zeit ernsthaft diskutiert [122]. Der Einfluß eines solchen Serins kann heute völlig verworfen werden, da die Proteinase K und alle anderen bisher untersuchten Mitglieder dieser Serin-Protease-Familie in dieser Position kein Serin enthalten (vergleiche auch Abb. 8.1).

7.5.3 Vergleich mit aktiven Zentren anderer Proteasen

Vergleicht man die aktiven Zentren von Subtilsin BPN und Proteinase K, so findet eine sehr hohe räumliche Homologie, die aufgrund der starken Verwandtschaftsbeziehung zwischen diesen beiden Enzymen nicht verwunderlich ist. Erstaunlich ist dagegen die Entdeckung gewesen, daß die geometrische Anordnung der aktiven Reste in den Enzymen der Subtilisin- und der Trypsin-Familie ebenfalls identisch ist, obwohl die Faltungen der Proteine völlig verschieden sind (siehe dazu auch Abb. 7.13 u. Abb. 7.14). Dies bedeutet, daß sich nach einer unabhängigen Evolution derselbe Katalyse-Mechanismus entwickelt hat und die gleiche räumliche Anordnung der aktiven Aminosäuren in sonst nicht miteinander verwandten Enzym-Familien zu einer Funktionskonvergenz geführt

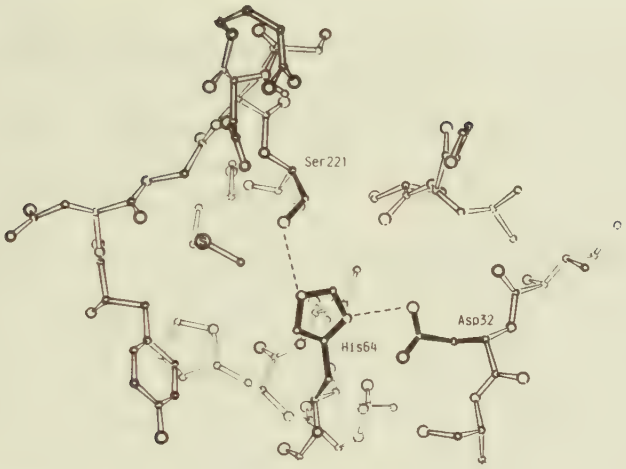


Abb. **7.12** zeigt im Vergleich zu Abb. **7.11** das aktive Zentrum von Subtilisin BPN .

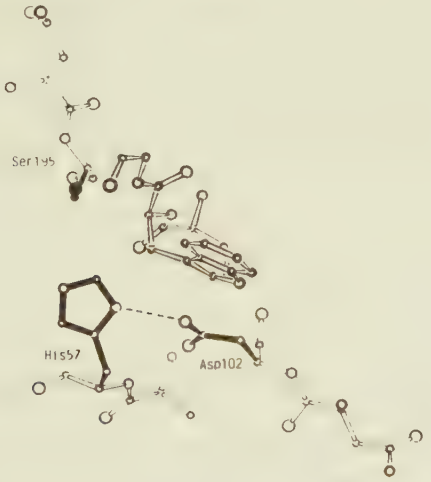


Abb. **7.13** zeigt den aktiven Bereich von Chymotrypsin. Die aktiven Aminosäuren sind in der gleichen Anordnung, wie sie im Subtilisin BPN und in der Proteinase K gefunden werden. Sie lassen sich beim direkten Vergleich leicht dem aktiven Zentrum der Proteinase K überlagern.

hat. Es an dieser Stelle nur am Rande erwähnt, daß diese Funktionskonvergenz sogar über die einzelnen Gruppen der Serin-Proteasen hinwegreicht und ähnliche geometrische Anordnungen der aktiven Reste auch bei den Cystein-Proteasen festgestellt worden sind [123].

Um die Geometrie der aktiven Bereiche im Detail zu vergleichen, wurde eine Kleinste-Quadrate-Anpassung von jeweils 25 funktionsäquivalenten Atomen von Proteinase K und Chymotrypsin an das aktive Zentrum von Subtilsin BPN ausgeführt. Die Abweichungen für die einzelnen Atome sind in Tabelle 7.5 enthalten. Sie betragen im Mittel 0.63 Å für Proteinase K und auch für Chymotrypsin nur 0.79 Å. Die größte Abweichung wurde jeweils für den OD2-Sauerstoff der Asparaginsäure festgestellt. An diesem quantitativen Vergleich wird noch einmal die Funktionskonvergenz des aktiven Zentrums für die aus unterschiedlichen Familien von Serin-Proteasen stammenden Enzymen deutlich. Um auch noch zu verdeutlichen, daß nicht nur die Faltung der Strukturen völlig unterschiedlich ist, sondern auch die Sequenzreihenfolge der aktiven Reste verschieden ist, zeigt Abb. 7.14 die Positionen der aktiven Aminosäuren und der Substratbindungsstellen in der Reihenfolge, wie sie in der Primärstruktur auftreten.

7.5.4 Die freie SH-Gruppe im aktiven Zentrum der Proteinase K

Interessant und charakteristisch für die Proteinase K ist die freie SH-Gruppe des Cystein 73 im aktiven Zentrum.

Eine direkte Teilnahme oder ein direkter Einfluß auf den Katalyse-Mechanismus kann aufgrund des Abstandes von 4.4 Å zur Histidin-seitengruppe ausgeschlossen werden. Zum anderen liegt die SH-Gruppe auch relativ verborgen hinter dieser aktiven Seitengruppe.

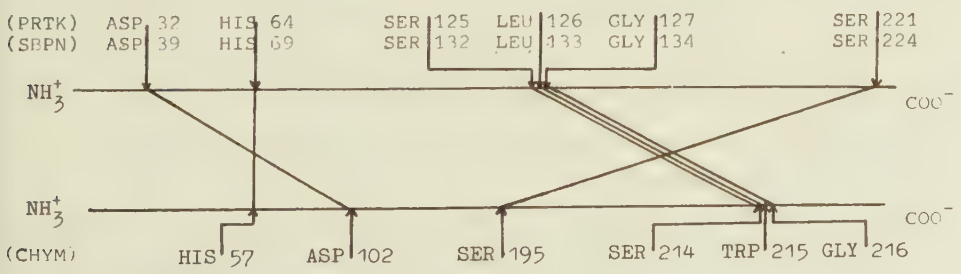
In welche Richtung die SH-Gruppe eine Wasserstoffbrücke ausbildet,

Tabelle **7.5**

Vergleich der aktiven Zentren von Subtilisin BPN mit Proteinase K und Chymotrypsin

SUBTILISIN BPN		PROTEINASE K			CHYMOTRYPSIN		
Atom	Amino-saure	Atom	Amino-saure	rms. (Å)	Atom	Amino-saure	rms. (Å)
CB	Asp-32	CB	Asp-39	0.7	CB	Asp-102	0.9
CG	Asp-32	CG	Asp-39	0.7	CG	Asp-102	1.1
OD2	Asp-32	OD2	Asp-39	1.7	OD2	Asp-102	2.1
OD1	Asp-32	OD1	Asp-39	0.4	OD1	Asp-102	0.6
CB	His-64	CB	His-69	0.5	CB	His-57	0.8
CG	His-64	CG	His-69	0.5	CG	His-57	0.5
ND1	His-64	ND1	His-69	0.2	ND1	His-57	0.5
CE1	His-64	CE1	His-69	0.5	CE1	His-57	0.5
NE2	His-64	NE2	His-69	0.2	NE2	His-57	0.4
CD2	His-64	CD2	His-69	0.3	CD2	His-57	0.8
CA	Ser-125	CA	Ser-132	0.6	CA	Ser-214	1.7
C	Ser-125	C	Ser-132	0.6	C	Ser-214	1.0
O	Ser-125	O	Ser-132	0.9	O	Ser-214	0.9
N	Leu-126	N	Leu-133	0.8	N	Trp-215	0.8
CA	Leu-126	CA	Leu-133	0.4	CA	Trp-215	0.5
C	Leu-126	C	Leu-133	0.4	C	Trp-215	0.3
O	Leu-126	O	Leu-133	1.0	O	Trp-215	1.2
CB	Leu-126	CB	Leu-133	0.6	CB	Trp-215	1.2
N	Gly-127	N	Gly-134	0.2	N	Gly-216	0.6
CA	Gly-127	CA	Gly-134	0.7	CA	Gly-216	0.3
C	Gly-127	C	Gly-134	0.5	C	Gly-216	0.6
O	Gly-127	O	Gly-134	1.6	O	Gly-216	0.7
CA	Ser-221	CA	Ser-224	0.3	CA	Ser-195	0.3
CB	Ser-221	CB	Ser-224	0.5	CB	Ser-195	0.4
OG	Ser-221	OG	Ser-224	0.9	OG	Ser-195	1.1
	mittlere Abweichung:		0.63 Å				0.79 Å

Abb. **7.14**



kann mit absoluter Sicherheit nicht geklärt werden, da es mit Röntgenstrahlung unmöglich ist, das Proton der SH-Gruppe bei der gegebenen Auflösung von 1.5 Å zu lokalisieren.

Tabelle 7.6

Wechselwirkungsabstände der freien SH-Gruppe (in Å u. in Grad)

SG 73	-	O	69	3.46
SG 73	-	O	224	3.43
SG 73	-	OD1	39	3.88

O 224 - SG 73 - O 69 152

Anhand der Abstände zu den umliegenden Sauerstoffatomen läßt sich jedoch folgendes Modell für die Wechselwirkungen der SH-Gruppe aufstellen: Die freien Orbitale stehen jeweils mit den Carbonyl-Sauerstoffen O 224 und O 69 in Wechselwirkung. Dies wird durch die symmetrische Konfiguration mit den S-O Abständen von 3.43 Å und 3.46 Å sowie dem O - S - O Winkel von 152 Grad bestärkt. Die Winkel, die bei direkten Wasserstoffbrücken zu diesen beiden Sauerstoffatomen ausgebildet würden, wären dagegen ziemlich ungünstig. Man kann daher weiter davon ausgehen, daß zwischen dem Sauerstoff OD1 der Aparaginsäure 39 eine Wasserstoff-Brücke mit einem S - O Abstand von 3.88 Å gebildet wird, da OD1 aufgrund der negativen Ladung ein besserer Wasserstoffbrücken-Akzeptor ist als die beiden Carbonylsauerstoffe. Dies könnte den größeren S....O-Abstand, der immer noch etwas kleiner ist als der van der Waals-Abstand von 4.05 Å, kompensieren.

Geht man von diesem Modell aus, so stellt man fest, daß durch die Wechselwirkungen der SH-Gruppe die drei Sekundärstrukturelemente des aktiven Zentrums miteinander verknüpft werden und so die Geometrie des aktiven Zentrums zusätzlich stabilisiert wird. Die

Annahme, daß dies zu einer höheren Aktivität des Katalyse-Mechanismus führt, kann jedoch nur hypothetisch sein .
Erwähnenswert ist an dieser Stelle eine Untersuchung, bei der durch gezielte Mutagenese in der Struktur des Subtilisins BPN das Methionin 222 (entspricht PRTK MET 225) nacheinander durch alle anderen 19 Aminosäuren ersetzt wurde [124]. Ziel dieser Studie war es, das Methionin, welches nach einer Oxidation zur Inaktivierung des Enzyms führt, durch andere Aminosäuren zu ersetzen und dadurch ein insgesamt unempfindlicheres Enzym zu erhalten. Erstaunlich war jedoch die Feststellung, daß das Enzym für alle anderen Aminosäuren, außer Cystein, an dieser Position weniger aktiv war. Für ein Cystein in der Position 222 stellte man dagegen gegenüber einem Methionin eine Aktivitätssteigerung um 38 % fest. Der Einfluß einer freien SH-Gruppe in dieser Position auf den Katalyse-Mechanismus kann ebenfalls nur spekulativ sein und muß noch genauer untersucht werden. Klarheit könnte auch hier eine kristallographische Inhibitorstudie des mutierten Enzyms bringen.

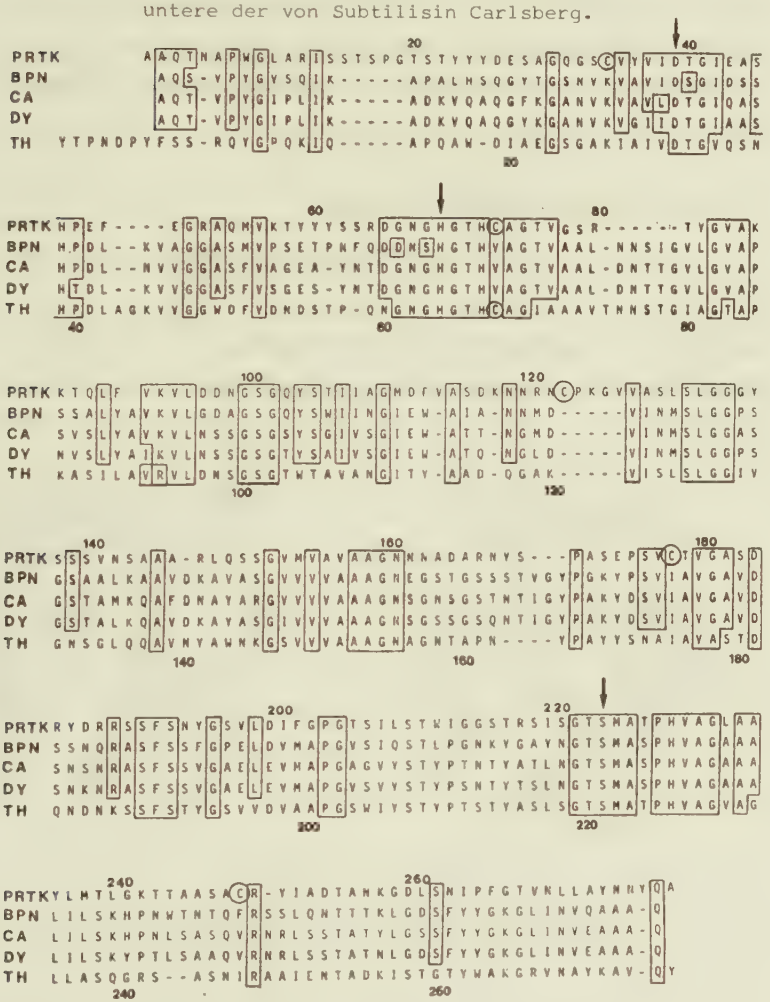
8. Strukturvergleich von Proteinase K mit Subtilisin BPN

8.1 Vergleich der Sequenz

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von Proteinase K mit entsprechenden Daten von Enzymen der Subtilisin-Familie zeigt eine Homologie der Primärstruktur von 35% bis 44% [66]. Die höchste Übereinstimmung liegt im Bereich der aktiven Reste ASP 39, HIS 69, SER 224 (nach Proteinase K Numerierung) und im sekundären Substratbindungsbereich von SER 132 - GLY 135. Weiterhin zeigen sich auch konservative Bereiche mit weitgehend ähnlichen Substitutionen. Auffälig ist weiter die hohe Sequenzhomologie im Bereich der zentralen Helix, die sich dort über fast 15 konservierte Reste hinzieht. Besonders zunennen ist hier das Prolin 228, das eigentlich in einer Helixstruktur nicht vorkommen sollte, aber offensichtlich in allen Enzymen dieser Familie an der gleichen Stelle ist und möglicherweise durch die Aufweitung der Helix unter dem aktiven Zentrum dem aktiven Serin eine gewisse Flexibilität bei der Reaktion mit dem Substrat verleiht.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Proteinase K und Subtilisin BPN ist die Anwesenheit von 5 Cysteinen in der Struktur der Proteinase K, von denen sich 4 zu Disulfidbrücken verknüpfen. Die freie SH-Gruppe nahe dem aktiven Zentrum wird dagegen auch in der Sequenz vom Thermitase und Thermomycolin in der gleichen Position festgestellt. Der Einfluß dieser SH-Gruppe auf die Katalyse-Aktivität ist zur Zeit noch nicht geklärt. Eine Inaktivierung des Enzyms durch das SH-Reagenz $HgCl_2$, das bei der Phasenbestimmung als Schweratomderivat eingesetzt und nahe dem aktiven Zentrum lokalisiert wurde, ist auch für Thermitase beobachtet

Abb. 8.1 zeigt einen Vergleich der Sequenz von Proteinase K (PRTK) mit Subtilisin BPN (BPN), Subtilisin Carlsberg (CA), Subtilisin DY (DY) und Thermitase (TH). Die obere Nummerierung entspricht der Proteinase K Sequenz, die untere der von Subtilisin Carlsberg.



Die aktiven Reste sind durch Pfeile gekennzeichnet, die Cysteine der Proteinase K und Thermitase sind eingekreist.

Sequenzreferenzen :

Subtilisin BPN	**109**
Subtilisin Carlsberg	**128**
Subtilisin DY	**129**
Thermitase	**126**

worden. Da die freie SH-Gruppe jedoch in der Kristallstruktur nicht frei zugänglich ist, findet die Inaktivierung des Enzyms möglicherweise über eine Bindung des Quecksilbers an das aktive Histidin statt. Untersuchungen, die darüber Klarheit verschaffen sollen, sind für die Zukunft geplant.

8.2 Vergleich der räumlichen Struktur

Die aus der Sequenzhomologie zu vermutende Homologie der räumlichen Struktur wird im Fall von Proteinase K und Subtilisin BPN bzw. NOVO gut bestätigt und ist daher auch für die anderen Mitglieder dieser Enzym-Familie zu erwarten.

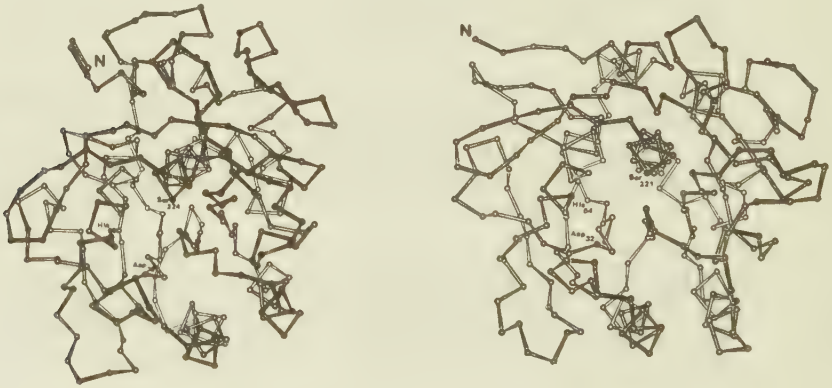


Abb. 8.2 zeigt im Vergleich Cα-Zeichnungen der Proteinase K (links) und des Subtilisins (rechts) mit Blick entlang der zentralen Helix. Die aktiven Reste und der N-Terminus sind entsprechend markiert.

Für einen Vergleich der räumlichen Struktur stehen bisher leider nur die Strukturen des Subtilisin BPN und Subtilsin NOVO zur Verfügung, die beide in Primär- und Tertiärstruktur gleich sind. Sie wurden zur gleichen Zeit in zwei verschiedenen Arbeits-

gruppen untersucht und danach ausführlich verglichen [130,132]. Hierbei wurde im Detail kein wesentlicher Strukturunterschied festgestellt. Von diesen beiden bisher nicht verfeinerten Strukturen wurde für einen Vergleich mit Proteinase K die offensichtlich etwas besser bestimmte Struktur des Subtilisin BPN herangezogen. Ein nach dem Algorithmus von Argos und Rossmann [103] ausgeführter Vergleich der C_α-Positionen von Proteinase K und Subtilisin ergab für 186 vergleichbare C_α-Positionen eine mittlere Abweichung von 1.13 Å. Bei diesem Wert muß natürlich berücksichtigt werden, daß die Struktur der Proteinase K gut verfeinert ist, während sich die Strukturdaten des Subtilisin BPN nur auf eine teilweise idealisierte Struktur stützen. Für eine verfeinerte Struktur des Subtilisin würde sich sicher noch eine etwas höhere Anzahl vergleichbarer C_α-Positionen ergeben. In Tabelle 8.1 sind für beide Proteine die entsprechenden Aminosäuren mit ihrer Sequenznummer und der ermittelten Abweichung in Å angegeben.

Die mittlere Abweichung von 1.13 Å für ca. 66 % der gesamten C_α-Atome stimmt jedoch sehr gut mit den Ergebnissen einer Studie überein, die sich mit dem Zusammenhang von Sequenz- und Strukturdivergenz in Proteinen befaßt hat [125]. Für eine mittlere Abweichung von 1.2 Å wurde dabei eine Sequenzhomologie von ca. 40 % vorrausgesagt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung stützen sich dabei auf die Daten von 25 verfeinerten Proteinstrukturen aus acht unterschiedlichen Proteinfamilien.

Die höchste räumliche Homologie zeigt sich wie aus Tabelle 8.1 zu ersehen ist, im Bereich der Sekundärstrukturelemente, die unteranderem auch mit jeweils sehr geringen Abweichungen die aktiven Reste enthalten. Daneben findet sich auch ähnlich zum Sequenzvergleich eine hohe Homologie im Bereich der Substratbindungsstellen. Deutlich wird die unterschiedliche Faltung am N-Terminus der beiden

Polypeptidketten und danach für Proteinase K das Fehlen des im Subtilisin enthaltenen kurzen Helixsegments im Bereich (BPN) von 14-20. Weiterhin fehlt bei Proteinase K auch am Ende der Polypeptidkette eine Helix, die bei Subtilisin im Bereich von 269-275 bis zum C-Terminus reicht. Alle weiteren Faltblatt- und Helixstrukturbereiche sind in beiden Proteinen räumlich gleich vorhanden.

Eine starke Konservierung findet man unter anderem für Proline. Neben dem schon vorher erwähnten Prolin in der zentralen Helix ist in der Proteinase K-Struktur das in der cis-Konfiguration vorliegende Prolin 171 auch im Subtilisin an der gleichen Stelle in dieser ungewöhnlichen Konfiguration zu finden [109].

Die beiden Disulfidbrücken der Proteinase K sind, wie der Vergleich zeigt, für die Faltung und Konformation des Moleküls nicht wichtig. Den Positionen dieser Cysteine läßt sich bis auf Cystein 123 jeweils in guter Näherung eine Aminosäure des Subtilisins zuordnen (siehe auch Tabelle 8.1). Man kann daher davon ausgehen, daß der gemeinsame Vorfahre von Subitilisin BPN und Proteinase K über Disulfidbrücken verfügte.

Eine ähnliche, für die Struktur der Proteine offensichtlich nicht relevante, Änderung der Anzahl der Disulfidbrücken findet man auch bei den Enzymen der Trypsin-Familie.

Abschließend kann man nach dem Vergleich der räumlichen Struktur von Proteinase K und Subtilisin mit Sicherheit davon ausgehen, daß auch die anderen bisher zu dieser Familie zugeordneten Proteine eine ähnliche räumliche Struktur besitzen. Mit Thermitase, Thermomycolin und Proteinase K, welche ein charakteristisches freies Cystein nahe dem aktiven Zentrum besitzen, läßt sich sogar eine Untergruppe in dieser Enzym-Familie definieren, die in der Natur möglicherweise weiter verbreitet ist als bisher angenommen wurde.

Tabelle 8.1 Die Legende befindet sich am Ende der Tabelle

	PRTK		BPN		rms.		PRTK		BPN		rms.
1	ALA					61	TYR				
2	ALA					62	SER				
3	GLN					63	SER				
4	THR					64	ARG				
5	ASN					65	ASP		60	ASP	0.869
6	ALA					66	GLY		61	ASP	1.204
7	PRO	↑	5	PRO	1.210	67	ASN		62	ASN	1.219
8	TRP	|	6	TYR	1.068	68	GLY	↑	63	SER	0.731
9	GLY	|	7	GLY	0.448	→ 69	HIS	|	64	HIS	0.283
10	LEU	α	8	VAL	0.490	70	GLY	|	65	GLY	0.603
11	ALA	|	9	SER	1.550	71	THR	|	66	THR	0.489
12	ARG	|	10	GLN	0.826	72	HIS	|	67	HIS	0.764
13	ILE	↓	11	ILE	0.506	★ 73	CYS	|	68	VAL	0.765
14	SER					74	ALA	α	69	ALA	0.636
15	SER					75	GLY	|	70	GLY	0.737
16	THR					76	THR	|	71	THR	0.883
17	SER					77	VAL	|	72	VAL	0.611
18	SER					78	GLY	|	73	ALA	1.056
19	GLY					79	SER	↓	74	ALA	1.151
20	THR					80	ARG				
21	SER					81	THR				
22	THR					82	TYR				
23	TYR					83	GLY		83	GLY	1.075
24	TYR					84	VAL		84	VAL	0.763
25	TYR					85	ALA		85	ALA	1.192
26	ASP					86	LYS	↑	86	PRO	1.071
27	GLU					87	LYS	|	87	SER	1.144
28	SER					88	THR	|	88	SER	1.168
29	ALA		22	THR	1.159	89	GLN	|	89	ALA	1.097
30	GLY		23	GLY	1.240	90	LEU	|	90	LEU	0.686
31	GLN		24	SER	1.120	91	PHE	|	91	TYR	0.631
32	GLY		25	ASN	1.150	92	GLY	β	92	ALA	0.532
33	SER		26	VAL	0.836	93	VAL	|	93	VAL	0.554
★ 34	CYS		27	LYS	1.022	94	LYS	|	94	LYS	0.634
35	VAL	↑	28	VAL	0.814	95	VAL	|	95	VAL	0.132
36	TYR	|	29	ALA	0.540	96	LEU	|	96	LEU	0.190
37	VAL	β	30	VAL	0.276	97	ASP	|	97	GLY	0.989
38	ILE	|	31	ILE	0.726	98	ASP	|	98	ASP	1.631
→ 39	ASP	↓	32	ASP	0.481	99	ASN	|	99	ALA	1.258
40	THR		33	SER	0.294	100	GLY	|			
41	GLY		34	GLY	1.120	101	SER	|			
42	ILE		35	ILE	0.761	102	GLY	|			
43	GLU		36	ASP	0.909	103	GLN	|			
44	ALA		37	SER	1.701	104	TYR	↑	104	TYR	0.529
45	SER		38	SER	1.811	105	SER	|	105	SER	0.687
46	HIS		39	HIS	0.779	106	THR	|	106	TRP	0.805
47	PRO		40	PRO	0.804	107	ILE	|	107	ILE	0.485
48	GLU		41	ASP	0.586	108	ILE	|	108	ILE	0.819
49	PHE					109	ALA	α	109	ASN	1.002
50	GLU					110	GLY	|	110	GLY	0.575
51	GLY					111	MET	|	111	ILE	0.774
52	ARG					112	ASP	|	112	GLU	1.405
53	ALA					113	PHE	|	113	TRP	1.423
54	GLN					114	VAL	|	114	ALA	0.543
55	MET					115	ALA	|	115	ILE	0.495
56	VAL					116	SER	↓	116	ALA	0.709
57	LYS		48	ALA	0.737	117	ASP				
58	THR		49	SER	1.061	118	LYS				
59	TYR					119	ASN				
60	TYR					120	ASN				

PRTK			BPN		rms.
121	ARG				
122	ASN				
*123	CYS				
124	PRO				
125	LYS				
126	GLY				
127	VAL				
128	VAL		121	VAL	0.585
129	ALA		122	ILE	1.002
130	SER		123	ASN	0.680
131	LEU	β	124	MET	0.387
132	SER		125	SER	0.422
133	LEU		126	LEU	0.486
134	GLY		127	GLY	0.556
135	GLY		128	GLY	0.842
136	GLY				
137	TYR				
138	SER				
139	SER				
140	SER				
141	VAL		135	LEU	1.436
142	ASN		136	LYS	1.816
143	SER		137	ALA	1.862
144	ALA		138	ALA	1.782
145	ALA		139	VAL	1.327
146	ALA	α	140	ASP	1.357
147	ARG		141	LYS	1.106
148	LEU		142	ALA	1.454
149	GLN		143	VAL	1.573
150	SER		144	ALA	1.186
151	SER		145	SER	1.662
152	GLY		146	GLY	1.249
153	VAL		147	VAL	1.119
154	MET		148	VAL	1.248
155	VAL		149	VAL	0.930
156	ALA	β	150	VAL	0.390
157	VAL		151	ALA	0.832
158	ALA		152	ALA	0.704
159	ALA		153	ALA	0.237
160	GLY		154	GLY	0.454
161	ASN		155	ASN	0.338
162	ASN		156	GLU	0.772
163	ASN				
164	ALA				
165	ASP				
166	ALA				
167	ARG				
168	ASN				
169	TYR				
170	SER		167	TYR	0.685
171	PRO		168	PRO	0.327
172	ALA		169	GLY	0.913
173	SER		170	LYS	0.848
174	GLU		171	TYR	1.008
175	PRO		172	PRO	0.221
176	SER		173	SER	0.934
177	VAL		174	VAL	1.451
*178	CYS		175	ILE	1.063
179	THR		176	ALA	1.194
180	VAL		177	VAL	1.163

PRTK			BPN		rms.
181	GLY		178	GLY	0.901
182	ALA		179	ALA	0.951
183	SER		180	VAL	0.633
184	ASP		181	ASP	1.165
185	ARG		182	SER	1.900
186	TYR		183	SER	1.561
187	ASP		184	ASN	0.895
188	ARG		185	GLN	0.651
189	ARG		186	ARG	0.735
190	SER		187	ALA	1.048
191	SER		188	SER	0.780
192	PHE		189	PHE	0.627
193	SER		190	SER	0.549
194	ASN		191	SER	0.746
195	TYR		192	VAL	1.745
196	GLY		193	GLY	1.281
197	SER		194	PRO	1.268
198	VAL		195	GLU	0.966
199	LEU		196	LEU	1.476
200	ASP		197	ASP	1.311
201	ILE		198	VAL	0.781
202	PHE		199	MET	0.889
203	GLY		200	ALA	0.883
204	PRO		201	PRO	0.337
205	GLY		202	GLY	0.306
206	THR		203	VAL	0.641
207	SER		204	SER	0.458
208	ILE		205	ILE	0.376
209	LEU		206	GLN	0.419
210	SER		207	SER	0.445
211	THR	β	208	THR	0.286
212	TRP		209	LEU	0.732
213	ILE		210	PRO	1.358
214	GLY		211	GLY	1.420
215	GLY				
216	SER		213	LYS	0.781
217	THR		214	TYR	0.491
218	ARG		215	GLY	0.727
219	SER		216	ALA	0.373
220	ILE		217	TYR	0.386
221	SER		218	ASN	0.749
222	GLY		219	GLY	0.648
223	THR		220	THR	0.778
224	SER		221	SER	0.510
225	MET		222	MET	0.504
226	ALA		223	ALA	0.661
227	THR		224	SER	0.700
228	PRO		225	PRO	0.770
229	HIS	α	226	HIS	0.424
230	VAL		227	VAL	0.688
231	ALA		228	ALA	0.431
232	GLY		229	GLY	0.714
233	LEU		230	ALA	0.489
234	ALA		231	ALA	0.184
235	ALA		232	ALA	0.169
236	TYR		233	LEU	0.899
237	LEU		234	ILE	0.715
238	MET		235	LEU	0.432
239	THR		236	SER	0.388
240	LEU		237	LYS	0.895

PRTK			BPN		rms.
241	GLY				
242	LYS				
243	THR				
244	THR				
245	ALA	↑			
246	ALA	|			
247	SER	|			
248	ALA	|	246	VAL	1.743
* 249	CYS	|	247	ARG	2.011
250	ARG	|	248	SER	1.781
251	TYR	α	249	SER	0.807
252	ILE	|	250	LEU	1.268
253	ALA	|	251	GLN	1.658
254	ASP	|	252	ASN	1.166
255	THR	|	253	THR	1.459
256	ALA	↓	254	THR	0.899
257	ASN		255	THR	1.173
258	LYS				
259	GLY				
260	ASP				
261	LEU				
262	SER				
263	ASN				
264	ILE				
265	PRO				
266	PHE				
267	GLY				
268	THR				
269	VAL				
270	ASN				
271	LEU				
272	LEU		267	LEU	0.313
273	ALA		268	ILE	0.995
274	TYR		269	ASN	1.046
275	ASN		270	VAL	1.603
276	ASN				
277	TYR				
278	GLN				
279	ALA				

Tabelle 8.1 gibt einen Vergleich der C_α - Positionen von Proteinase K (PRTK) und Subtilisin BPN (BPN). Die vergleichbaren Bereiche des Subtilisin sind mit ihrer Sequenznummerierung und ihrer mittleren Abweichung (rms.) in Å neben der Proteinase K Sequenz aufgeführt. Die Helix- und Faltblattstrukturbereiche sind entsprechend gekennzeichnet. Die aktiven Aminosäuren sind mit einem Pfeil und die Cysteine der Proteinase K mit einem Stern markiert.

9. Inhibitorstudien

9.1 Einleitung

Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur eines Enzyms erlaubt noch keinen eindeutigen Rückschluß auf die Art der Substratbindung und des Katalyse-Mechanismus.
Solche Informationen lassen sich aus kristallographischen Inhibitorstudien ermitteln. Da Proteinkristalle bis zu 70% Lösungsmittel enthalten, können kleinere Inhibitormoleküle in die Kanäle zwischen den Proteinmolekülen eindiffundieren (siehe auch Abb.7.9 B) und ihren Weg zu den spezifischen Bindungsstellen finden. Wenn, wie meist beobachtet, die Kristallstruktur eines solchen Komplexes sich von der des nativen Proteinkristalls nicht wesentlich unterscheidet, so kann die Lage des Inhibitormoleküls mit der Differenzfourier- Methode ermittelt werden. Hierbei wird, wie im folgenden beschrieben, aus den Differenzen der Röntgenintensitäten der beiden Proteinkristalle (nativ und Inhibitor-Komplex) sowie den Phasenwinkeln der vorher möglichst gut verfeinerten nativen Proteinstruktur die Elektronendichte für den Inhibitor berechnet, so daß dieser in das existierende Modell für das native Modell eingebaut werden kann.
Die experimentellen Arbeiten mit einem Dipeptid-Chlormethylketon-Proteinase K-Inhibitorkomplex wurden zu einem Zeitpunkt ausgeführt, zu dem die eigentliche Verfeinerung der Proteinase K noch nicht abgeschlossen war, aber ein Ende abzusehen war.
Der Untersuchung ging eine theoretische Studie voraus, die sich allein auf die Hilfsmittel der Computer-Grafik stützte. Hierbei wurden verschiedene Inhibitoren des Subtilisins BPN dem aktiven Zentrum der Proteinase K angepaßt und deren mögliche Bindungs-

stellen im Vergleich zum Subtilisin analysiert. Zu diesen Inhibitoren gehörten unterschiedlich zusammengesetzte Peptid-Chlormethylketon-Inhibitoren, die mit ihrer reaktiven Chlorketon-Gruppe das aktive Histidin und Serin irreversibel kovalent blockieren, sowie ein Phenylboronsäure-Inhibitor, der an das OG des aktiven Serin kovalent bindet. Die Ausgangskoordinaten dieser Inhibitoren wurden aus Veröffentlichungen einiger Subtilisin-Inhibitorstudien übernommen [133-136]. Es zeigte sich, daß diese Inhibitoren nach leichten Konformationsänderungen ohne Schwierigkeiten dem aktiven Zentrum der Proteinase K angepaßt werden konnten. Durch diese Arbeiten wurde zusätzlich die hohe Strukturhomologie, besonders im Bereich der aktiven Zentren, dieser beiden Enzyme verdeutlicht.

9.2 Kristallisation von Proteinase K im Komplex mit einem synthethischen Inhibitor

Der Dipeptid-Inhibitor Z-Ala-Ala-Chlormethylketon wurde in Stuttgart unter der Anleitung von Prof Dr. Jany nach einer entsprechenden Vorschrift [150] synthetisiert . Z steht dabei für die Carbobenzoxy-Schutzgruppe des Inhibitors.
Vorraussetzung für diese Untersuchung war die Feststellung , daß Proteinase K auch im kristallinem Zustand aktiv ist [137]. Hiervon ausgehend wurden native Kristalle wie in Abschn. 4.1. beschrieben hergestellt und anschließend für 8 Tage in eine Inhibitorlösung gelegt (Soaking-Technik). Da der Inhibitor selbst wasserunlöslich ist, wurde eine 3mM Lösung in 100% Methanol hergestellt und anschließend durch Zugabe von Kristallisationspuffer auf 8mM verdünnt. Die endgültige Methanolkonzentration der Inhibitorlösung betrug 50% . Es zeigte sich, daß die mit dieser Lösung behandelten Kristalle im Gegen-

satz zu nativen Kristallen nach Auflösen in Wasser gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Ala-p-nitroanilid nicht mehr aktiv waren. Damit konnten wir davon ausgehen, daß der Inhibitor am aktiven Zentrum gebunden war. Beim Vergleich von Präzessionsaufnahmen deutete sich die Bindung des Inhibitors durch leichte Änderungen der Intensitäten gegenüber Aufnahmen des nativen Kristalls an. Die Zellkonstanten waren mit geringen Abweichungen innerhalb ca. 0.5 % vergleichbar.

9.3. Datensammlung und Auswertung

Um die Reflexintensitäten der Inhibitorkomplex-Kristalle bei der Differenzfourier-Methode möglichst genau mit denen der nativen Kristalle vergleichen zu können, wurden dieselben Meßbedingungen gewählt. Die Daten wurden bis 2.2 Å Auflösung auf der Arndt-Wonacott-Kamera mit konventioneller Röntgenstrahlung auf einem Drehanodengenerator gesammelt und mit dem OPTRONICS Filmscanner digitalisiert. Die Reflexintensitäten wurden anschließend, analog zu der schon vorher beschriebenen Datensammlung bis 2.2 Å Auflösung, mit dem MOSCO-Programmsystem integriert und zu Strukturfaktoramplituden reduziert. Die Einzelheiten der Datensammlung sind Tabelle 9.1 zusammengefaßt.

Tabelle 9.1

Generatorleistung	40 kV, 70 mA / 2.8 kW / Fokus 0.2x2 mm^2
Wellenlänge	$CuK\alpha$ / Graphit Monochromator / 1.54182 Å
Film	KODAK DEF-2
Filmkassetten	flach, maximaler Radius 60 mm
Kollimator	0.6 mm
Kristall-Film Abstand	70 mm
maxiamle Auflösung	2.2 Å
totaler Drehwinkel	50° (Drehachse: c-Achse)
Drehwinkel für jede Aufnahme	2°
Anzahl der Filme	75 (25 Aufnahmen mit je drei Filmen)
Bestrahlungszeit	4000 sec/Grad ; 2.2 h
Gesamtzahl der Reflexe	41796
davon unabhängig gemittelt	11705
R(I) Merge	7.9 %

Ein Vergleich der vorher sehr sorgfältig aufeinander skalierten nativen- und Inhibitorkomplex-Strukturamplituden ergab für 10170 Reflexe im Bereich von 2.2 Å bis 5.0 Å einen Vergleichs R(F)-Faktor von 14.3 % .

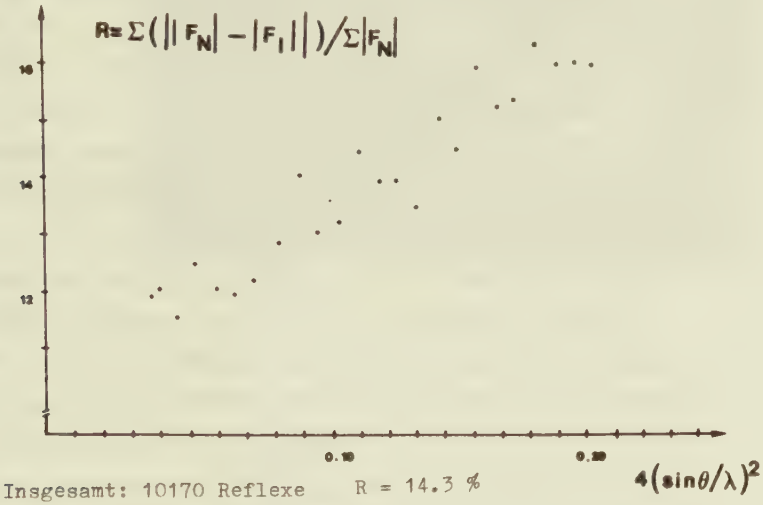


Abb. 9.1 zeigt die Auftragung des R-Faktors (Definition in der Abb.) in Abhängigkeit von der Auflösung . F_C entspricht dabei den Strukturamplituden des Proteinase K Inhibitorkomplexes und F_N den der nativen Proteinase K. Der in guter Näherung lineare Anstieg des R-Faktors ist ein sicheres Anzeichen für eine leichte Strukturänderung bzw. für eine erfolgreiche Inhibitorbindung und außerdem bezeichnend für die gute Qualität der aufeinander skalierten Datensätze.

Differenz-Elektronendichten wurden bis 2.5 Å Auflösung mit den Koeffizienten ($F_I - F_N$) und ($2F_I - F_N$) berechnet. Die Phasen wurden aus der Strukturfaktorberechnung des zu diesem Zeitpunkt bei 2.2 Å Auflösung bis zu einem R-Faktor von 24 % verfeinerten Proteinase K-Modells übernommen. Die anschließende Interpretation und Anpassung des Inhibitors an die Elektronendichte wurde wieder mit dem Programmsystem FRODO [91] am PS300 Grafik-Gerät ausgeführt.

9.4 Interpretation und Verfeinerung

Die (F_I - F_N) Differenz-Elektronendichte zeigte einen deutlichen Verlauf positiver Elektronendichte beginnend an der Seitengruppe des aktiven HIS 69 und von dort parallel zur Proteinase K-Hauptkette von SER 132 bis zu GLY 134 (siehe Abb. 9.2). Die ($2F_I$ -F_N) Dichte zeigte ineinanderübergehende Dichte vom Inhibitor zum HIS 69 und SER 224. Damit wird die Interpretation einer kovalenten Bindung zwischen dem Methylenkohlenstoff des Inhibitors und dem NE2-Stickstoff des Histidins, die mit einer leichten Drehung der Histidinseitengruppe um die C_α- $C_\beta$und C_β- C_γBindungen verbunden ist, bestätigt. Zusätzlich wird auch die kovalente Bindung zwischen dem OG Sauerstoff des aktiven SER 224 und dem Keton-Carbonyl-Kohlenstoff des Inhibitors deutlich. Diese Bindung erfordert, daß der Carbonyl-Kohlenstoff eine tetraedrische hemiketale Konfiguration einnimmt. Sie wird stabilisiert durch die beiden Wasserstoffbrücken zwischen dem Sauerstoffanion und der Seitengruppe von ASN 161 sowie des Peptidstickstoffs von SER 224. Zusätzlich zu diesen Bindungen wird der Inhibitor durch einige N-H...O-Wasserstoffbrücken zwischen der Peptidkette des Inhibitors und und der Hauptkette der Proteinase K fixiert.

Bei genauer Betrachtung dieser Wechselwirkungen findet man ein dreifaches antiparalleles Faltblatt, in dessen Mitte der Inhibitor liegt und jeweils daneben die Bereiche SER 132-GLY 134 und GLY 100-SER 101 des Enzyms (siehe Abb. 9.3 u. 9.4). Die Gesamtstruktur der Proteinase K bleibt gegenüber der Bindung des Inhibitors weitgehend unbeeinflußt, doch deuten einige leichte Maxima in der Elektronendichte (siehe Abb. 9.2) auf eine geringfügige Konformationsänderung des Enzyms im aktiven Zentrum hin. Vergleicht man die Bindungsgeometrie der Oligopeptidinhibitoren

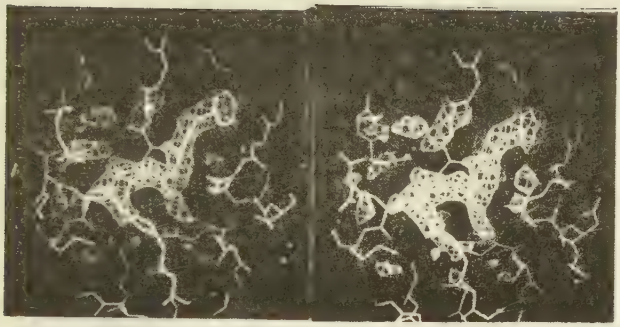


Abb. **9.2** Stereoansicht der Differenz-Elektronendichte bei 2.5 Å zwischen dem Proteinase K- Inhibitor-Komplex und nativer Proteinase K. Überlagert ist die Struktur des Inhibitors.
Bei der Bindung des Inhibitors an Proteinase K wird das Chlor durch den NE2 Stickstoff des His69 ersetzt.

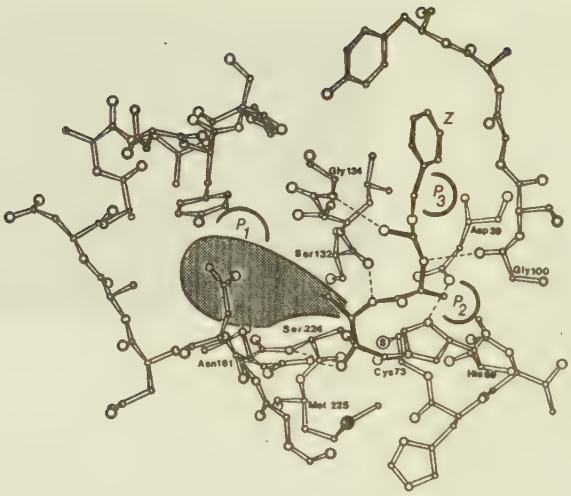


Abb. **9.3** zeigt den Bereich des aktiven Zentrums mit dem Carbobenzoxy-Ala-Ala-Chlormethylketon Inhibitor. Die Bindungen innerhalb des Inhibitors und die kovalenten Bindungen zum NE2-Stickstoff des His69 und zum OG-Sauerstoff des Ser224 sind schwarz ausgefüllt eingezeichnet. Die P_1,P_2 und P_3 Position des Inhibitors sind entsprechend gekennzeichnet. Die Carbobenzoxy-Schutzgruppe ist, wie in der Literatur allgemein üblich,mit einem Z markiert. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind gestrichelt eingezeichnet. Die P_1-Position ist schattiert und deutet darauf hin, daß eine Seitengruppe in dieser Position keinen räumlichen Beschränkungen unterliegt.

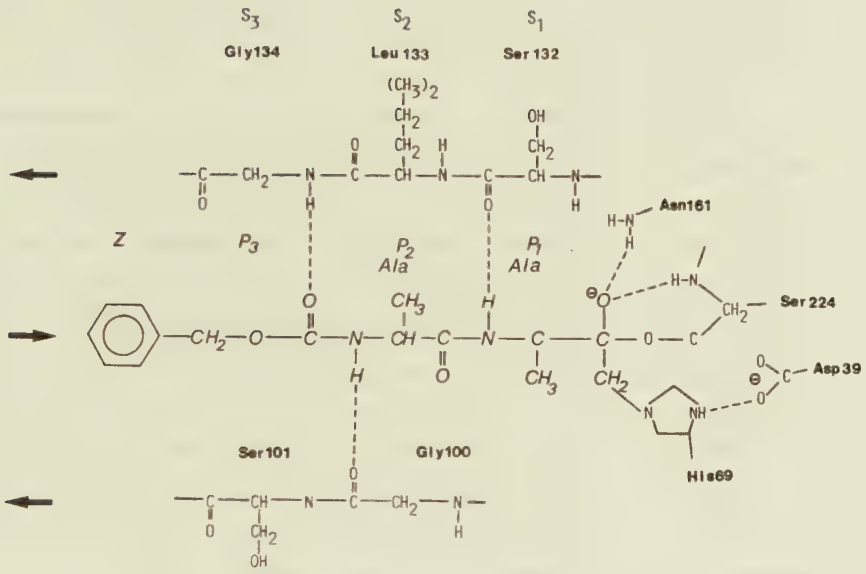


Abb. **9.4** zeigt anhand einer Schemazeichnung die Bindung des Carbobenzoxy-Ala-Ala-Chlormethylketon Inhibitors im aktiven Zentrum der Proteinase K. Die Atome des Inhibitors sind kursiv gekennzeichnet. Wasserstoffbrückenbindungen sind gestrichelt eingezeichnet. S_1,S_2 und S_3 sind die Bindungspositionen des Substrats am Enzym. P_1,P_2 und P_3 sind die entsprechenden Positionen am Substrat bzw. am Inhibitor. Die Pfeile auf der linken Seite deuten die Richtung der jeweiligen Peptidkette im dreisträngigen antiparallelen Faltblatt an, welche zwischen Inhibitor and Proteinase K ausgebildet wird.

im aktiven Zentrum von Subtilisin BPN [136] mit der der Proteinase K, so findet man, wie schon in Absch. 9.1 angedeutet, mehrere Ähnlichkeiten.

Durch den bevorzugten Angriff auf Peptidbindungen nach hydrophoben oder aromatischen Aminosäuren zeigt Subtilisin eine dem Chymotrypsin ähnliche Spezifität [139]. Die Erkennung der entsprechenden Seitengruppe geschieht in der Substrat-spezifischen S1-Mulde, die von hydrophoben Seitengruppen umgeben ist und daher hydrophile oder geladene Seitengruppen des Substrats in der P1-Position abweist. Proteinase K zeigt eine ähnliche Spezifität der S1-Mulde, die außerdem sehr geräumig ist und daher einer Seitengruppe der Aminosäure in P1-Position kaum eine Begrenzung auferlegt. Dadurch läßt sich schließlich die hohe und relativ unspezifische Aktivität der Proteinase K erklären, die schon bei der Spaltungsaktivität gegenüber der B-Kette des Insulins beschrieben wurde [138].

Das Proteinase K - Inhibitor-Modell wurde abschließend mit dem Programmsystem PROLSQ verfeinert. Nach 23 Verfeinerungszyklen konvergierte der ursprüngliche R-Faktor von 30.1 % für die Daten im Bereich von 5.0 Å - 2.5 Å bei 22.4 % für 9400 Reflexe mit $F > 3\sigma(F)$ im Auflösungsbereich von 5.0 Å - 2.2 Å . Lösungsmittelatome wurden dabei nicht berücksichtigt. Die Standardabweichungen der stereochemischen Parameter ergaben sich zu :

0.025 Å für die kovalenten Bindungsabstände
0.058 Å für die 1 - 3 Bindungsabstände
0.018 Å für die planare Gruppen
und 5.1° für den Winkel ω der Peptidebene.

Die Koordinaten der Inhibitoratome sind in Tabelle 9.2 aufgeführt. Die Ergebnisse dieses Abschnittes sind bereits in einer Zusammenfassung veröffentlicht [140].

Tabelle 9.2

Atombez.			X	Y	Z	B ($Å^2$)
CC	KET		-17.725	17.318	10.601	8.92
N	ALA	P1	-21.428	18.397	11.235	7.11
CB	ALA	P1	-22.394	16.248	10.639	6.23
CA	ALA	P1	-21.310	16.982	11.442	6.55
C	ALA	P1	-19.895	16.677	10.928	6.81
O	ALA	P1	-19.768	15.656	10.211	6.64
N	ALA	P2	-21.516	21.628	13.090	12.94
CB	ALA	P2	-19.275	21.568	12.014	12.28
CA	ALA	P2	-20.482	20.788	12.395	12.29
C	ALA	P2	-20.259	19.599	13.350	12.74
O	ALA	P2	-21.287	18.815	13.271	13.55
C		P3	-23.634	20.787	13.500	11.67
O		P3	-23.351	19.790	12.818	11.39
CD2	Z		-25.426	24.195	15.328	12.79
CE2	Z		-26.305	25.270	15.194	12.90
CZ	Z		-27.737	24.979	15.348	12.98
CE1	Z		-28.005	24.014	16.332	13.73
CD1	Z		-27.084	22.913	16.482	13.37
CG	Z		-25.921	22.922	15.670	12.86
O1	Z		-23.621	22.010	15.195	14.73
CB	Z		-25.519	21.683	14.927	12.23

Um noch zusätzlichen detaillierten Aufschluß über die Bindungs- und Substratspezifität der Proteinase K auch in den Positionen P1 und P3 zu erhalten, sind weitere Strukturuntersuchungen mit synthetischen Inhibitoren geplant. Hierbei soll vor allem die Bindung und Konformation der Aminosäuren Lysin, Arginin und Phenylalanin in der Position P1 und von Prolin in der Position P2 untersucht werden.

Entsprechende Inhibitor-Synthesen werden bereits ausgeführt. Eine vor kurzem veröffentlichte Untersuchung, die einen biochemischen Vergleich der Substratspezifität der Proteinase K, des Subtilisins BPN und der Thermitase anhand einiger synthetischer Oligopeptide beschreibt [149], verdeutlicht das steigende wissenschaftliche Interesse an den Proteinen dieser Enzym-Familie.

9.5 Kristallisation des bifunktionalen Proteinase/Amylase Inhibitors PKI-3 aus Weizenkeimen und seines Komplexes mit Proteinase K

Da die verfeinerte Struktur der Proteinase K eine ideale Ausgangsbasis auch für umfangreichere Studien mit natürlichen Inhibitoren bietet ,wurden einige Untersuchungen in dieser Richtung begonnen. Da sich diese Untersuchungen zur Zeit erst in einem Anfangsstadium befinden, soll an dieser Stelle nur ein kurzer Überblick über die bisher ausgeführten Arbeiten gegeben werden. Sie wurden bereits veröffentlicht und umfassen die Aufreinigung des Inhibitormaterials, einige Bindungsstudien, sowie eine Reihe von Kristallisationsversuchen [66].

Bisher konnten in der Arbeitsgruppe von Prof. Jany in Stuttgart aus Weizenkeimen drei natürliche Inhibitoren der Proteinase K isoliert werden. Sie werden als PKI1, PKI2 und PKI3 bezeichnet. PKI3 inhibiert kein Enzym der Trypsin-Familie, interessanterweise dagegen Proteinase K und α-Amylase aus Insekten . Dies bedeutet, daß der Inhibitor wahrscheinlich zwei Bindungsstellen für zwei gänzlich verschiedene Enzyme enthält. Bislang war die Kristallisation des nativen Inhibitors mit einem Molekulargewicht von ca. 21000 und dessen Komplex mit Proteinase K erfolgreich. Sie wurde in unserer Gruppe von Dr. Pal ausgführt. PKI3 ist der größte der drei erwähnten Inhibitoren und bindet an Proteinase K im Verhältnis 1:1 . Seine Aminosäurezusammensetzung ist ähnlich zu einem aus Gerste isolierten Subtilisin-Inhibitor [141]. Weitere Verwandtschaft oder sogar Identität zu einem ebenfalls aus Weizen isolierten bifunktionalen Inhibitor [142] ist zur Zeit noch nicht völlig geklärt [143] .

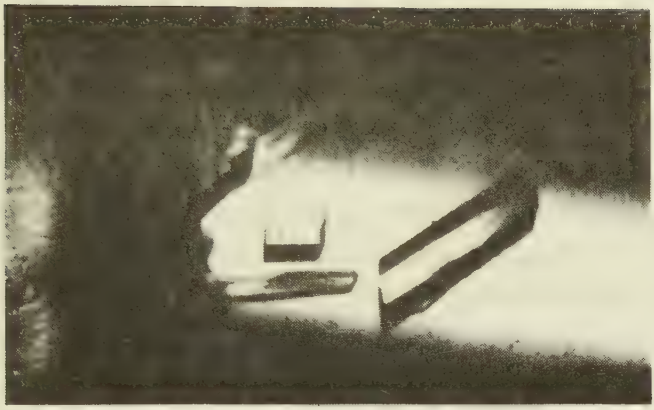


Abb. 9.6 zeigt die nativen PKI3 Kristalle, die durch Mikrodialyse gegen einen Polyethylen enthaltenden Puffer (pH 6.7) innerhalb von 3-5 Tagen bis zu einer Größe von 2 x 1 x 0.6 mm^3 wachsen.

Die Diffraktion der Kristalle ist sehr gut und reicht bis mindestens 2.0 Å Auflösung. Die Raumgruppe dieser Kristalle ist $P2_1$ mit den Zellkonstanten a=42.5 Å, b=65.3 Å, c=31.5 Å und β=110° .

Abb. 9.7 zeigt einige Kristalle des Proteinase K - PKI3 Komplexes. Sie kristallisieren durch Mikrodialyse aus einer zu gleichen Teilen gemischten Proteinase K - PKI3 Lösung. Die nadelförmigen Kristalle haben einen Durchmesser von ungefähr 0.05 mm. Erste Untersuchungen zur Bestimmung der Raumgruppe mit konventioneller Röntgenstrahlung und mit Synchrotronstrahlung waren bisher erfolglos. An der Verbesserung der Kristallgröße und Qualität wird zur Zeit noch gearbeitet.

Die Strukturanalyse des nativen Inhibitors und dessen Komplex mit Proteinase K ist für die nahe Zukunft geplant. Sie soll Klarheit über die molekularen Mechanismen der Inhibition, der Proteinerkennung, sowie der Proteinbindung liefern und weiterhin Aufschluß über mögliche Konformationsänderungen der Proteinase K gegenüber dem nativen Zustand erbringen.

Ähnliche Untersuchungen wurden bisher nur am Trypsin-Inhibitor BPTI [144,145], dem Sojabohnen Trypsin-Inhibitor STI [146], dem Streptomyces Subtilisin-Inhibitor SSI [147] und dem aus Blutegeln isoliertem Subtilisin-Inhibitor Eglin [148,151] ausgeführt. Die geplanten Strukturuntersuchungen werden daher auch einen weiteren Beitrag zum Verständnis des molekularen Mechanismus und der Inhibition der Serin-Proteasen liefern. Interessant dürfte dazu auch eine vergleichende Strukturanalyse des PKI3-α-Amylase Komplexes sein sowie die Strukturuntersuchung eines Gesamtkomplexes zwischen α-Amylase, Proteinase K und dem PKI3-Inhibitor.

10. Zusammenfassung und Ausblick

Grundlage für die Hochauflösungs-Strukturuntersuchung der Proteinase K war der Aufbau des Meßplatzes zur Filmdatensammlung und die Installation eines Auswertesystems, welches neben konventioneller Röntgenstrahlung auch die Parameter der Synchrotronstrahlung berücksichtigt. Diese Arbeiten wurden erfolgreich abgeschlossen. Das Filmdatensystem wird heute routinemäßig in der Arbeitsgruppe angewandt. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß auch bei Anwendung von Synchrotronstrahlung durch sorgfältige Filmauswertung Daten hoher Qualität erhalten werden können.
Die anschließende Hochauflösungs-Strukturanalyse der Proteinase K bis 1.5 Å hat die wesentlichen strukturellen Zusammenhänge und die charakteristischen Eigenschaften dieses Enzyms zu Tage gebracht, die bei der kristallographischen Ermittlung der Kettenfaltung bei 3.2 Å Auflösung noch nicht zu erkennen waren.
Ein wesentliches Merkmal des Enzyms ist das stark ausgeprägte Wasserstoffbrücken-Netzwerk, das wohl hauptsächlich zur hohen Stabilität dieses globulären Proteins beiträgt und in dieser Komplexität bisher selten bei Proteinen beobachtet wurde. Es ist offensichtlich auch verantwortlich für die bis zu hoher Auflösung hervorragende Diffraktion der Proteinase K-Kristalle.
Beim Vergleich der Geometrie des aktiven Zentrums von Proteinase K mit dem des verwandten Subtilisin und den strukturell sehr verschiedenen, jedoch ähnlich funktionierenden Enzymen Chymotrypsin und Trypsin, konnte gezeigt werden, daß im aktiven Zentrum die drei für den Katalyse-Mechanismus verantwortlichen Reste die gleiche sterische Anordnung haben. Es ist damit offensichtlich, daß sich im Laufe der Evolution derselbe Katalyse-Mechanismus für zwei nicht miteinander verwandte Enzym-Familien entwickelt hat und zu einer Funktionskonvergenz geführt hat.

Die hier untersuchte Proteinase K ist das erste zur Subtilisin-Familie gehörende Enzym, dessen Kristallstruktur bis zu hoher Auflösung verfeinert und im Detail interpretiert wurde. Die strukturellen Parameter des aktiven Zentrums und besonders die Anwesenheit einer freien SH-Gruppe und eines in die zentrale Helix eingebauten Prolins bringen erneut neue Aspekte bezüglich des Katalyse-Mechanismus der Serin-Proteasen. Die Hochauflösungs-Strukturanalyse der Proteinase K liefert damit zusammen mit der Entdeckung der freien SH-Gruppe die Grundlage zur Charakterisierung einer neuen Untergruppe in der Familie der Subtilisine.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden auch die Basis für weitere gezielte biochemische und kristallographische Untersuchungen, die sich unter anderem mit der gezielten Mutagenese einiger Aminosäuren im aktiven Zentrum und der sekundären Substratbindungsstellen befassen werden. Neben den gut verfeinerten Strukturparametern können auch die gut lokalisierten Wasserlagen in solche Arbeiten mit einbezogen werden.

Die detaillierte Analyse der ausgedehnten Wasserstruktur würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Hierzu ist außerdem für die Zukunft eine Neutronenbeugungsstudie geplant, die neben der genauen Analyse der Wasserstoffbrücken auch Einblick in die Lage und Funktion der Protonen im aktiven Zentrum bringen wird.

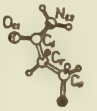
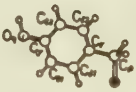
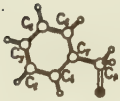
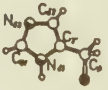
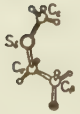
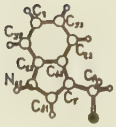
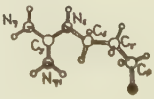
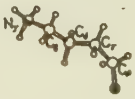
Die im letzten Kapitel dieser Arbeit beschriebenen Studien über die Bindung eines synthetischen Inhibitors in das aktive Zentrum der Proteinase K hat einen wesentlichen Einblick in die Substratbindungs-Geometrie des aktiven Zentrums geliefert und bildet auch hier die Basis für eine Reihe weiterer Inhibitor-Komplex-Untersuchungen. Diese werden sich sowohl über eine Reihe von synthetischen Inhibi-

toren als auch über natürlichen Inhibitoren, wie den kristallin vorliegenden Inhibitor aus Weizenkeimen erstrecken.
Wegen der gut verfeinerten Strukturparameter stellt die Proteinase K schließlich ein ideales Untersuchungsobjekt für zeitauflösende kristallographisch-enzymkinetische Untersuchungen mit Synchrotronstrahlung dar.

11. Anhang

11.1 Nomenklatur der Aminosäuren

Abb. 11.1 zeigt die Stereochemie und Nomenklatur der Aminosäuren. Die Abkürzungen sind im Drei- und Ein-Buchstaben-Symbol angegeben.

	Glycin	Gly	G		Serin	Ser	S
	Alanin	Ala	A		Threonin	Thr	T
	Valin	Val	V		Asparagin	Asn	N
	Isoleucin	Ile	I		Glutamin	Gln	Q
	Leucin	Leu	L		Tyrosin	Tyr	Y
	Phenylalanin	Phe	F		Histidin	His	H
	Prolin	Pro	P		Asparagin-säure	Asp	D
	Methionin	Met	M		Glutamin-säure	Glu	E
	Tryptophan	Trp	W		Arginin	Arg	R
	Cystein	Cys	C		Lysin	Lys	K

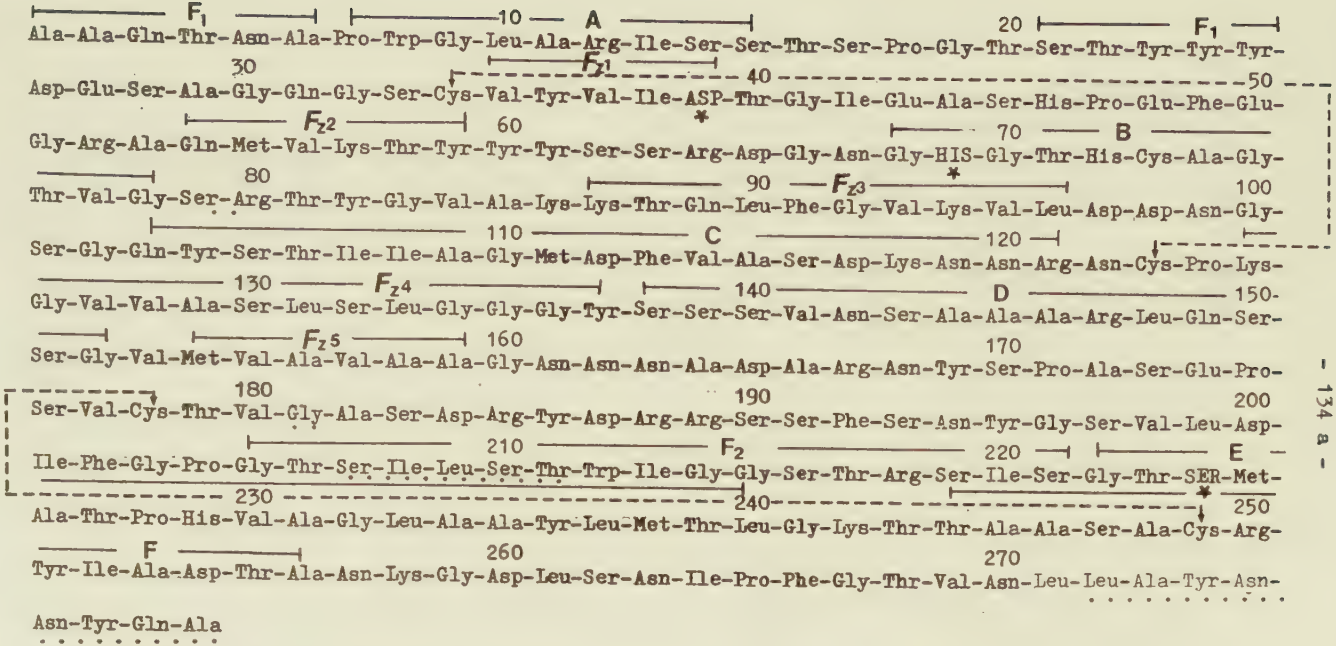


Abb. 11.2 zeigt die Primärstruktur der Proteinase K. Die aktiven Reste sind mit Großbuchstaben und zusätzlich mit einem Stern versehen. Die beiden Disulfidbrücken sind gestrichelt eingezeichnet. Die α-Helices und die Faltblattbereiche sind wie in Abschnitt 7 beschrieben bezeichnet. Die durch die Verfeinerung ermittelten Änderungen der chemisch bestimmten Sequenz sind durch Sternchen markiert.

11.2 Literaturverzeichnis

1 R.M. Stroud (1974). Scientific American **88**, 74-88

2 G.E. Schulz und R.H. Schirmer (1979). ´Principles of Protein Structures´, Springer Verlag; New York, Heidelberg, Berlin

3 L.N. Johnson (1984). ´Enzyme-Substrate Interactions´, Inclusion Compounds **3**, Academic Press; London, New York

4 A. Fersht (1977). ´Enzyme Structure and Mechanism´ W.H. Freemann and Company; San Francisco

5 D.M. Blow, J.J. Birkhoft, B.S. Hartley (1969). Nature **221**, 337-346

6 D.M. Blow (1976). Acc. Chem. Res. **9**, 145-152

7 A.A. Kossiakoff und S.A. Spencer (1980). Nature **288**, 414-416

8 J. Moult, J. Sussman und M.N.G. James (1985). J. Mol. Biol. **182**, 555-556

9 U.W. Arndt und A.J. Wonacott (1977). ´The Rotation Method in Crystallography´, Amsterdam: North Holland

10 M.J. Bürger (1942). ´X-ray Crystallography´ (ed. John Wiley) New York

11 N.H. Xuong und S.T. Freer (1971). Acta Cryst. **B27**, 2380-2390

12 P.M.B. Walker (1953). J. Sci. Instrum. **30**, 162-164

13 W.A. Wooster (1955). J. Sci. Instrum. **32**, 457-460

14 S. Abrahamson (1966). J. Sci. Instrum. **43**, 931-933

15 U.W. Arndt, R.A. Crowther und J.F.W. Malett (1968). J. Sci. Instrum. 1, 510-516

16 U.W. Arndt, J.N. Champness, R.P. Phizackerley und A.J. Wonacott (1973). J. Appl. Cryst. **6**, 457-463

17 J.R. Helliwell (1982). Nucl. Instrum. Meth. **201**, 153-174

18 H. Morimoto und R. Uyeda (1963). Acta Cryst. **16**, 1107-1119

19 W.C. Phillips und G.N. Phillips Jr. (1985). J. Appl. Cryst. **18**, 3-7

20 M. Elder (1982). ´Computational in Crystallography´, 19-29 (ed. D. Sayre) Clarendon Press, Oxford,

21 S. Abrahamson, O. Lindqvist und A. Wlodawer (1981). J. Appl. Cryst. **14**, 256-260

22 W.A. Wooster, (1964). Acta. Cryst. **17**, 878-882

23 J.W. Jeffrey, (1969). Acta. Cryst. **A25**, 153-157

24 A. Wlodawer (1974). J. Appl. Cryst. **7**, 19-21

25 J.R. Einstein und B.W. McClelland, (1974).
J. Appl. Cryst. **7**, 599-603

26 B.W. Matthews, C.E. Klopfstein und P.M. Colman (1972).
J. Phys. Sci. Instrum. **5**, 353-359

27 S. Abrahamson, P. Kierkegaard, E. Andersson, O. Lindquist,
G. Landgren und L. Sjolin (1980).
J. Appl. Cryst. **13**, 310-337

28 J.R. Helliwell, et al. (1981).
Acta Cryst. **A37**, C 311-312

29 F.K. Winkler, C.E. Schutt und S.C. Harrison (1979).
Acta Cryst. **A35**, 901-911

30 P.A. Machin, A. Wonacott und D. Moss (1983).
Daresbury News **10**, 3-9

31 L.V. Azoroff (1953). Acta Cryst. **8**, 701-704

32 E.J.W. Wittaker (1953). Acta Cryst. **6**, 218-

33 P. Schwager, K. Bartels und R. Huber (1973).
Acta Cryst. **A29**, 291-295

34 G.C. Fox und K.C. Holmes (1966). Acta Cryst. **20**, 886-891

35 K. Wilson und D. Yeates (1979). Acta Cryst. **A35**, 146-157

36 C.C.F. Blake und D.C. Phillips (1962). Biological Effects
of Ionizing Radiation at the Molecular Level, pp 183-191,
Vienna: International Atomic Energy Agency

37 T.J. Greenhough und J.R. Helliwell (1982).
J. Appl. Cryst. **15**, 338-351

38 I.J. Clifton, D.W.J. Cruickshank, G. Diakan, M. Elder,
J. Habash, J.R. Helliwell, R.C. Liddington, P.A. Machin
und M.Z. Papiz (1985). J. Appl. Cryst. **18**, 296-300

39 M.F. Schmid, L.H. Weaves, M.A. Holmes, M.G. Grütter,
D.H. Ohlendorf, R.A. Reynolds, S.J. Remington und
B.W. Matthews (1981). Acta Cryst. **A37**, 701-710

40 T.L. Blundell und L.N. Johnson (1976).
'Protein Crystallography', Academic Press, London

41 J. Schwinger, (1949). Phys. Rev. **75**, 1912-1925

42 H.D. Bartunik, R. Fourme und J.C. Phillips (1982).
'Uses of Synchrotron Radiation in Biology'
(ed. H.B. Stuhrmann), Academic Press, London

43 T.J. Greenhough und J.R. Helliwell (1983). Prog. Biophys. molec. Biol. **41**, 67-123

44 G. Rosenbaum, K.C. Holmes und J. Witz (1971). Nature **230**, 434-437

45 A. Harmsen, R. Leberman und G.E. Schulz (1976). J. Mol. Biol. **104**, 311-314

46 H.D. Bartunik (1985). Phot. Factory Rev. Lett. **3**,

47 H.D. Bartunik, T. Gehrmann und B. Robrahn (1984). J. Appl. Cryst. **17**, 120

48 H.D. Bartunik, P.N. Clout und B.Robrahn (1981). J. Appl. Cryst. **14**, 134-136

49 H.D. Bartunik und P. Schubert (1982). J. Appl. Cryst. **15**, 227-231

50 H.D. Bartunik (1983). Nucl. Instr. Meth. **208**, 523-533

51 H.D. Bartunik (1984). Rev. Phys. Appl. **19**, 671-675

52 E. Arnold, J.W. Erickson, E.A. Frankenberger, H.J. Hecht, M. Luo, M.G. Rossmann und G. Vriend (1984). Proc. 13th Int. Congr. Hamburg C-48 0.2 7-2

53 A. Yonath, H.D. Bartunik, K.S. Bartels und H.G. Wittmann (1984). Proc. 13th Int. Congr. Hamburg C-49 0.28-2

54 K.S. Wilson, E.A. Stura, D.L. Wild, R.J. Todd, D.I. Stuart, Y.S. Babu, J.A. Jenkins, T.S. Standing, L.N. Johnson, R. Fourme, R. Kahn, A. Gadet, K.S. Bartels und H.D. Bartunik (1983). J. Appl. Cryst. **16**, 28-41

55 J.R. Helliwell (1985).´Crystallography in Molecular Biology´ 49, EMBO Lecture Course, Bischenberg; Frankreich

56 U.W. Arndt (1984). J. Appl. Cryst. **17**, 118-119

57 J.M. Bijvoet (1949). Proc. Acad. Sci. Amst. **52**, 313

58 G. Viena, M.G. Rossmann, E. Arnold, M. Luo, J.P. Griffith und K. Moffat (1986). J. Appl. Cryst. **19**, 134-139

59 W.A. Hendrickson und M.M. Teeter (1981). Nature **290**, 107-113

60 J.R. Helliwell (1984). Rep. Prog. Phys. **47**, 1403-1497

61 J.R. Helliwell (1985). ´Progress in X-Ray Studies by Synchrotron Radiation´ 1(C)4 , Strasburg ; Frankreich

62 Daresbury Laboratory News (1985) 15, 1-22 (ed. P. Machin, A. Wonacott und D.Moss)

63 R.Kahn, R. Fourme, A. Gadet, J. Janin, C. Dumas und D. Andre (1982). J. Appl. Cryst. **15**, 330-337

64 G. Materlik und P. Suortti (1984). J. Appl. Cryst. **17**, 7-12

65 J.C. Phillips, A. Wlodawer, J.M. Goodfellow, K.D. Watenpaugh, L.C. Sieker, L.H. Jensen und K.O. Hodgson (1977). Acta Cryst. **A33**, 445-455

66 G.P. Pal, Ch. Betzel, K.D. Jany und W. Saenger (1986). FEBS Lett. **197**, 111-113

67 K.C. Chou, G. Nemethy, S. Ramsey, R.W. Tuttle und H.A. Scheraga (1985). J. Mol. Biol. **186**, 591-609

68 P.C. Moews, T. Sakumaki und J.R. Knox (1986). J. Appl. Cryst. **19**, 101-104

69 A.J.C. Wilson (1942). Nature **151**, 3796

70 U.W. Arndt (1968). Acta Cryst. **B24**, 1355-1357

71 J. Kraut, J.D. Robertus,J.J. Birktoft,R.A. Alden,P.E. Wilcox und J.C. Powers (1977). Cold Spring Harbor Symp. **36**, 117-123

72 M. Jacobs, M. Eliasson, M. Uhlen und J.I. Flock (1985). Nucleic Acids Research **13**, 8913-8925

73 W. Ebeling, N. Hennrich, M. Klochow, H. Metz, H.D. Orth und H. Lang (1974). Eur. J. Biochem. **47**, 91-97

74 K.J. Dattagupta, T. Fukiwara, E.V. Grishin, K. Lindner, P.C. Manor, N.J. Pianiazek, W. Saenger und D. Suck (1975). J. Mol. Biol. **97**, 267-271

75 K. Lindner (1976). Diplomarbeit, Universität Göttingen

76 A. Pähler (1983). Dissertation, Universität Göttingen

77 A. Pähler, A. Banerjee, J.K. Dattagupta, T. Fukiwara, K. Lindner, G.P. Pal, D. Suck, G. Weber und W. Saenger (1984). EMBO Journal **3**, 1311-1314

78 K.D. Jany (1985) persönliche Mitteilungen

79 U. Wiegers und H. Hilz (1981). Biochem. Biophys. Res. Commun. **44**, 513-519

80 T.A. Jones (1978). J. Appl. Cryst. **11**, 268-272

81 T.A. Jones (1983). in 'Computational Crystallography', (ed. D. Sayre) 303-317, Oxford University Press

82 D.M. Blow und F.C. Crick (1959). Acta Cryst. **12**, 794-

83 L.F. Ten Ecky (1973). Acta Cryst. **A29**, 183-191

84 W.A. Hendrickson (1981). in 'Refinement of Protein Structures' (ed. P.A. Machin, J.W. Campbell und M. Elder) Daresbury Laboratory News, Daresbury, Warrington, England

85 J. Deisenhofer, S.J. Remington, W. Steigemann (1985). in 'Methods in Enzymology ', 115, 303-323 (ed. H.W. Wyckoff, C.H.W. Hirs und S.N. Timasheff)

86 R. Diamond (1971). Acta Cryst. **A27**, 436

87 J.L. Sussman (1984). in 'Methods and Applications in Crystallographic Computing' 206 - 237 (ed. S.R. Hall und T. Ashida) Oxford University Press, Oxford, U.K.

88 A. Jack und M. Levitt, (1978). Acta Cryst. **A34**, 931

89 W.A. Hendrickson und J.H. Konnert (1981). in 'Biomolecular Structure, Function, Conformational Evolution' (ed. R. Srinivasan) **1**, 43-57, Pergamon Press, Oxford

90 W.R. Busing, K.O. Martin und H.A. Levy (1962). ' ORFLS ', ORNL-TM-305 Oak Ridge Nat. Lab., OAK Ridge, Tennessee, USA

91 W.A. Hendrickson und L.E. Lattmann (1970). Acta Cryst. **B26**, 136-142

92 M.A. Holmes und B.W. Matthews (1982). J. Mol. Biol. **160**, 623-639

93 Y. Higachi, M. Kasunoki, Y. Matsaura, N. Yasuoko und M. Kakudo, (1984). J. Mol. Biol. **172**, 109-139

94 G.A. Sim (1959). Acta Cryst. **12**, 813-815

95 K.D. Jany und B. Mayer (1985). Biol. Chem. Hoppe-Seyler **366**, 485-492

96 K.D. Jany, G. Lederer und B. Mayer (1986). FEBS Letters **199**, 139-144

97 H.G. Gassen (1986) persönliche Mitteilungen

98 T.N. Bhat und G.H. Cohen (1984). J. Appl. Cryst. **17**, 244-248

99 P.V. Luzatti (1952). Acta Cryst. **5**, 802-816

100 R.B. Honzatko, W.A. Hendrickson und W.E. Love (1985). J. Mol. Biol. **184**, 147-164

101 B.C. Finzel, P.C. Weber, K.D. Hardman und F.R. Salemme (1985). J. Mol. Biol. **186**, 627-643

102 P.A. Machin, A. Wonacott und D. Moss (1984). Daresbury Laboratory News **13**, 17-19

103 M.G. Rossmann und P. Argos (1975). J. Biol. Chem. **250**, 7525-7532

104 C. Ramakriskna und G.N. Ramachandran (1965). Biophys. J. **5**, 909-933

105 J.S. Richardson (1981). 'Protein Anatomy' Adv. Prot. Chem. **21**, 167-339

106 W.N. Lipscomb, J.C. Coppola, J.A. Hartsuck, M.L. Ludwig H. Muirhead, J. Searl und T.A. Steitz (1966). J. Mol. Biol. **19**, 423

107 M. Levitt und C. Chothia (1976). Nature **261**, 552-557

108 E.N. Baker (1980). J. Mol. Biol. **141**, 441-484

109 C.S. Wright, R.A. Alden und J. Kraut (1969). Nature **221**, 235-242

110 J. Moult, F. Sussman und M.N.G. James (1985). J. Mol. Biol. **182**, 555-566

111 W.G.J. Hol, L.M. Halie und S. Sander (1981). Nature **294**, 532-536

112 W.G.J. Hol, P.T. van Duijnen und H.J.C. Berendsen (1978). Nature **273**, 443-446

113 A. Wlodawer, R. Bott und L. Sjolin (1981). J. Biol. Chem. **257**; 1325-1332

114 B. Asboth und L. Polgar (1983). Biochemistry **22**, 117-122

115 W.W. Bachovchin und J.D. Robertus (1978). J. Am. Chem. Soc. **100**, 8041-8047

116 M.W. Hunkapiller, S.H. Smallcombe, D.R. Whitaker und J.H. Richards (1973). J. Biol. Chem. **248**, 8306-8308

117 J.P. Elrod, J.L. Hogg, D.N. Quinn, K.S. Venkalosabbon und R.L. Schowen (1980). J. Am. Chem. Soc. **102**, 3917-3922

118 F. Jordan und L. Polgar (1981). J. Am. Chem. Soc. **20**, 6366-6370

119 A.A. Kossiakoff und S.A. Spencer (1980). Nature **288**, 414-416

120 A.A. Kossiakoff und S.A. Spencer (1981). Biochemistry **20**, 6462-6474

121 H.Tsukada und D.M. Blow (1985). J. Mol. Biol. **184**, 703-741

122 J. Kraut (1977). Ann. Rev. Biochem. **46**, 331-358

123 R.M. Garavito, M.G. Rossmann, P. Argos und W. Eventoff (1977). Biochemistry **16**, 5065-5071

124 D.A. Estell, T.P. Graycar und J.A. Wells (1985). J. Biol. Chem. **260**, 6518-6521

125 C. Chothia und A. Lesk (1986). EMBO Journal **5**, 823-826

126 B. Meloun, M. Baudys, V. Kostka, G. Hausdorf, C. Frömmel und W.E. Höhne (1985). FEBS Letters **183**, 195-200

127 G.M. Gaucher und K.J. Stevenson (1976). Methods Enzymol. **45**, 415-433

128 E. Smith, R. DeLange, W. Evans, M. Landon und F. Markland (1968). J. Biol. Chem. **243**, 2184-2191

129 P. Neakov, W. Oberthür und G. Braunitzer (1983). Hoppe Seyler´s Z. Physiol. Chem. **364**, 1537-1540

130 J.D. Robertus, R.A. Alden und J. Kraut (1971). Bioch. Biophys. Res. Comm. **42**, 334-339

131 J. Drenth, W.G.J. Hol, J.N. Jansonius und R. Koekoek (1972). Eur. J. Biochem. **26**, 177-181

132 J. Drenth, W.G.J. Hol, J.N. Jansonius und R. Koekkoek (1972) Cold Spring Harbor Symp. **36**, 107-116

133 J.D. Robertus, J.Kraut, R.A. Alden und J. Birktoft (1972). Biochemistry **11**, 4293-4303

134 T.L. Poulos, R.A. Alden, S.T. Freer, J.J. Birktoft und J. Kraut (1976). J. Biol. Chem. **251**, 1097-1103

135 D.A. Matthews, R.A. Alden, J.J. Birktoft, S.T. Freer und J. Kraut (1975). J. Biol. Chem. **250**, 7120-7126

136 J.D. Robertus, R.A. Alden, J.J. Birktoft, J. Kraut, J.C. Powers und P.E. Wilcox (1972). Biochemistry **11**, 2439-2449

137 G.P. Pal (1985). persönliche Mitteilungen

138 E. Kraus, H.H. Kiltz und U.E. Femfert (1976). Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. **357**, 233-237

139 J. Kraut, J.D. Robertus, J.J. Birktoft, R.A. Alden, P.E. Wilcox und J.C. Powers (1971). Cold Spring Harbor Symp. **36**, 117-123

140 Ch. Betzel, G.P. Pal, M. Struck, K.D. Jany und W. Saenger (1986). FEBS Letters **197**, 105-110

141 J. Hejegaurd, I. Svendsen und J. Mundy (1983). Carlsberg Res. Commun. **48**, 91-94

142 J. Mundy, J.Hejegaurd und I. Svendsen (1984). FEBS Letters **167**, 210-212

143 I. Svendsen (1986). persönliche Mitteilungen

144 A. Rühlmann, D. Kukta, P. Schwager, K. Bartels und R. Huber (1973). J. Nol. Biol. **77**, 417-436

145 R. Huber, D. Kukta, W. Bode, P. Schwager, K. Bartels, J. Deisenhofer und W. Steigemann (1974). J. Mol. Biol. **89**, 73-101

146 R.M. Sweet, H.T. Wright, J. Janin, C.H. Chothia und D,M, Blow (1974). Biochemistry **13**, 4212-4228

147 S. Hirono, A. Akagawa, Y. Mitsui und Y. Iitaka (1984). J. Mol. Biol. **78**, 389-413

148 C.A. McPhalen, H.P. Schneble und M.N.G. James (1985). FEBS Letters **188**, 55-58

149 D. Brömme, K. Peters, S. Frink und S. Fittkau (1986). Arch. Biochem. Biophys. **244**, 439-446

150 R. Leary (1977). Biochemistry **16**, 5857

151 W. Bode, E. Papamokos, D. Musil, U. Seemueller und H. Fritz (1986). EMBO Journal **5**, 813-818

152 J.R. Helliwell (1985). J. Mol. Struc. **130**, 63-91

153 J.M. Thornton (1981). J. Mol. Biol. **151**, 261-287

154 E.N. Baker und R.E. Hubbard (1984). Prog. Biophys. molec. Biol. **44**, 97-179

11.2 Tabellen

Die Tabellen mit den beobachteten und berechneten Strukturfaktoren sind aus Platzersparnis nicht in die Arbeit aufgenommen. Sie würden ca. 100 Seiten in Anspruch nehmen. Sie können auf Wunsch vom Autor unter der Adresse

Institut für Kristallographie
Freie Universität Berlin
Takustraße 6
1 Berlin 33

bezogen werden.

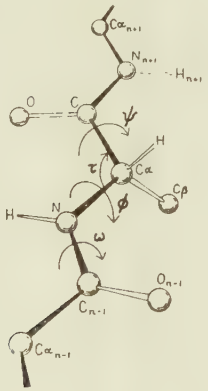


Abb. 11.3 zeigt die Definition der Winkel innerhalb der Polypeptidkette.

Tabelle **11.1** Torsionswinkel der Polypeptidkette von Proteinase K

Amino-säure	Nr.	ϕ	ψ	ω
ALA	1		161	-179
ALA	2	-147	133	176
GLN	3	-108	114	-179
THR	4	-83	152	-178
ASN	5	49	40	176
ALA	6	-72	155	168
PRO	7	-50	143	-174
TRP	8	-53	-37	-175
GLY	9	-68	-37	175
LEU	10	-63	-45	179
ALA	11	-57	-39	-170
ARG	12	-64	-42	-179
ILE	13	-68	-14	-178
SER	14	-113	16	-178
SER	15	-133	155	176
THR	16	-88	-15	-176
SER	17	-127	146	170
PRO	18	-69	168	176
GLY	19	78	6	176
THR	20	-88	164	-175
SER	21	-126	1	177
THR	22	-108	132	176
TYR	23	-97	112	-179
TYR	24	-102	133	-176
TYR	25	-159	155	173
ASP	26	-70	139	-175
GLU	27	-68	-10	175
SER	28	-57	-37	170
ALA	29	48	37	178
GLY	30	80	6	-179
GLN	31	-62	137	178
GLY	32	99	-18	175
SER	33	-95	162	177
CYS	34	-131	139	176
VAL	35	-124	123	173
TYR	36	-88	123	175
VAL	37	-104	108	-177
ILE	38	-97	104	-166
ASP	39	-165	-141	179
THR	40	-86	-1	-176
GLY	41	112	-177	-177
ILE	42	-137	131	173
GLU	43	-80	90	-172
ALA	44	-65	-21	-179
SER	45	-81	-3	-179
HIS	46	-61	128	-179
PRO	47	-50	-31	-177
GLU	48	-65	-15	179
PHE	49	-90	-20	173
GLU	50	58	32	179
GLY	51	75	10	177
ARG	52	-88	-1	178
ALA	53	-109	147	172
GLN	54	-152	143	171
MET	55	-77	139	-177
VAL	56	-123	-19	-178
LYS	57	-160	135	167
THR	58	-119	159	172
TYR	59	-117	4	177
TYR	60	-120	-174	-173
TYR	61	-65	-28	-177
SER	62	-128	161	177
SER	63	-96	-2	-176
ARG	64	-84	149	174
ASP	65	-77	104	179
GLY	66	-94	0	-173
ASN	67	-107	-58	178
GLY	68	122	-32	-174
HIS	69	-54	-48	-177
GLY	70	-63	-41	174
THR	71	-62	-40	177
HIS	72	-62	-50	-179
CYS	73	-60	-49	179
ALA	74	-55	-40	-176
GLY	75	-62	-37	176
THR	76	-69	-34	175
VAL	77	-65	-51	-168
GLY	78	-150	21	173
SER	79	-71	159	178
ARG	80	-57	-51	-174
THR	81	-87	-35	-170
TYR	82	-108	5	-168
GLY	83	-109	153	-178
VAL	84	-75	-46	-171
VAL	85	-116	90	-163
LYS	86	-73	-9	-178
LYS	87	-119	10	177
THR	88	-72	161	175
GLN	89	-93	131	-179
LEU	90	-110	136	178
PHE	91	-126	127	-176
GLY	92	-101	136	175
VAL	93	-124	114	-174
LYS	94	-94	100	177
VAL	95	-104	-17	-177
LEU	96	-104	141	177
ASP	97	-74	-179	-177
ASP	98	-73	-6	171
ASN	99	-91	-3	-176
GLY	100	83	13	177
SER	101	-98	155	176
GLY	102	-156	151	172
ALA	103	-86	153	-178
TYR	104	-62	-39	-179
SER	105	-59	-34	178
THR	106	-78	-30	173
ILE	107	-70	-37	176
ILE	108	-59	-46	178
ALA	109	-57	-39	-178
GLY	110	-64	-39	176
MET	111	-66	-47	178
ASP	112	-58	-36	-178
PHE	113	-60	-46	-178
VAL	114	-60	-42	-178
ALA	115	-56	-36	179
SER	116	-82	-51	-173
ASP	117	-56	-32	-175
LYS	118	-61	-25	178
ASN	119	-69	-17	176
ASN	120	-104	20	-176

Amino-säure	Nr.	ϕ	ψ	ω
ARG	121	-122	152	174
ASN	122	-96	97	-178
CYS	123	-129	64	-175
PRO	124	-51	-34	-176
LYS	125	-90	-4	177
GLY	126	120	172	-170
VAL	127	-133	135	-178
VAL	128	-123	147	171
ALA	129	-126	131	-178
SER	130	-116	118	-174
LEU	131	-120	91	179
SER	132	-94	66	-179
LEU	133	-157	170	174
GLY	134	163	170	176
GLY	135	-156	-157	-177
GLY	136	-63	160	-178
TYR	137	-50	132	176
SER	138	-147	124	-175
SER	139	-75	-26	-179
SER	140	-72	-36	-179
VAL	141	-69	-44	-179
ASN	142	-57	-44	-176
SER	143	-65	-35	176
ALA	144	-62	-43	177
ALA	145	-64	-41	177
ALA	146	-61	-44	175
ARG	147	-57	-47	178
LEU	148	-56	-49	176
GLN	149	-57	-47	-176
SER	150	-66	-24	177
SER	151	-69	-14	175
GLY	152	110	34	-179
VAL	153	-118	134	173
MET	154	-74	105	179
VAL	155	-94	123	175
ALA	156	-116	128	-177
VAL	157	-128	153	178
ALA	158	-73	143	175
ALA	159	-71	-28	-177
GLY	160	104	159	-170
ASN	161	-111	40	-175
ASN	162	-103	5	-172
ASN	163	46	47	-177
ALA	164	-140	178	-179
ASP	165	-72	123	-176
ALA	166	-66	-6	-179
ARG	167	-62	-19	-176
ASN	168	-98	13	-173
TYR	169	-130	146	-179
SER	170	-126	146	-2
PRO	171	-78	8	-179
ALA	172	-50	-39	-171
SER	173	-79	-5	178
GLU	174	-72	116	-177
PRO	175	-61	-33	-173
SER	176	-73	-12	-178
VAL	177	-98	-176	-177
CYS	178	-107	108	-174
THR	179	-94	123	-171
VAL	180	-111	123	173

Amino-säure	Nr.	ϕ	ψ	ω
GLY	181	-95	174	-176
ALA	182	-114	144	171
SER	183	-122	167	177
ASP	184	-110	176	-174
ARG	185	-52	-31	-173
TYR	186	-102	16	178
ASP	187	65	33	174
ARG	188	-103	141	165
ARG	189	-50	133	175
SER	190	-59	143	-174
SER	191	-62	-25	-179
PHE	192	-93	-8	-172
SER	193	-65	131	167
ASN	194	-63	162	179
TYR	195	-144	-164	178
GLY	196	116	170	-174
SER	197	-65	-20	-177
VAL	198	-79	-16	179
LEU	199	-63	143	175
ASP	200	-101	-29	-166
ILE	201	-169	158	172
PHE	202	-113	147	166
GLY	203	-137	172	-179
PRO	204	-61	126	-177
GLY	205	-138	-4	177
THR	206	-104	124	176
SER	207	57	64	-176
ILE	208	-100	118	175
LEU	209	-80	129	175
SER	210	-157	-178	178
THR	211	-63	153	174
TRP	212	-137	168	179
ILE	213	-69	156	-178
GLY	214	83	19	-178
GLY	215	62	34	-176
SER	216	-113	-166	-178
THR	217	-144	157	-174
ARG	218	-162	149	175
SER	219	-106	125	178
ILE	220	-139	168	-174
SER	221	-128	146	175
GLY	222	157	165	170
THR	223	-66	-20	170
SER	224	-57	-32	-178
MET	225	-82	-31	-178
ALA	226	-70	-41	-177
THR	227	-52	-48	179
PRO	228	-68	-23	175
HIS	229	-63	-43	-177
VAL	230	-73	-39	176
ALA	231	-60	-43	175
GLY	232	-64	-40	179
LEU	233	-62	-43	178
ALA	234	-59	-48	179
ALA	235	-56	-44	-178
TYR	236	-60	-46	-179
LEU	237	-70	-37	176
MET	238	-64	-41	177
THR	239	-69	-24	172
LEU	240	-75	-12	179

Amino-säure	Nr.	ϕ	ψ	ω
GLY	241	78	17	-176
LYS	242	-78	-28	-170
THR	243	-157	177	-178
THR	244	-126	172	179
ALA	245	-58	-41	-179
ALA	246	-64	-31	-173
SER	247	-117	10	-175
ALA	248	-64	-40	-176
CYS	249	-64	-44	175
ARG	250	-61	-45	177
TYR	251	-58	-44	-178
ILE	252	-68	-33	175
ALA	253	-67	-39	-177
ASP	254	-67	-31	-174
THR	255	-105	6	-179
ALA	256	-67	162	167
ASN	257	-73	128	-175
LYS	258	-110	131	174
GLY	259	76	15	-178
ASP	260	-80	-25	-173
LEU	261	-87	150	176
SER	262	-114	165	179
ASN	263	73	22	177
ILE	264	-93	114	177
PRO	265	-64	144	178
PHE	266	-53	132	179
GLY	267	101	-11	174
THR	268	-104	139	177
VAL	269	-62	146	176
ASN	270	-114	73	-176
LEU	271	-138	127	-177
LEU	272	-118	127	-177
ALA	273	-52	136	-174
TYR	274	-148	137	-176
ASN	275	-88	-8	-175
ASN	276	55	33	-170
TYR	277	-74	136	-174
ALA	278	-132	98	176

Tabelle 11.2 A Wasserstoffbrücken der Hauptketten Stickstoffatome zu den Hauptketten Sauerstoffatomen. Die Symbole am linken Rand geben jeweils die Bezeichnung und den Bereich der Sekundärstrukur an, wie sie in Abschnitt 7 erklärt ist.

Bez.	Donor	Akzeptor	N....O (Å)	N-H...O (Å)	N-H...O (°)
	N 3	O 23	2.98	1.83	162.5
	N 6	O 21	2.94	2.08	140.2
	N 10	O 7	3.18	2.45	130.2
	N 11	O 7	3.25	2.30	165.9
	N 12	O 8	2.93	2.06	147.7
	N 13	O 9	3.15	2.20	154.1
	N 14	O 11	3.15	2.22	149.8
	N 15	O 12	3.23	2.26	159.5
	N 23	O 3	2.85	1.88	169.1
	N 25	O 1	3.02	2.04	166.5
	N 29	O 26	3.05	2.20	148.0
	N 31	O 28	2.92	1.96	170.0
	N 33	O 30	3.14	2.14	156.1
	N 35	O 89	2.83	1.93	167.5
	N 36	O 128	2.81	1.82	171.2
	N 37	O 91	2.83	1.88	165.7
	N 38	O 130	3.19	2.14	167.7
	N 39	O 93	2.96	2.03	159.2
	N 46	O 43	3.12	2.14	163.0
	N 49	O 46	2.99	1.96	166.8
	N 50	O 47	3.21	2.34	142.9
	N 52	O 49	2.89	1.98	156.8
	N 54	O 90	2.97	2.10	140.3
	N 56	O 92	2.91	1.94	165.8
	N 59	O 94	3.09	2.45	128.9
	N 72	O 68	2.92	2.04	154.7
	N 73	O 69	2.97	1.98	158.3
	N 74	O 70	2.87	1.93	167.0
	N 75	O 71	2.93	2.05	145.8
	N 76	O 72	3.12	2.23	146.4
	N 77	O 73	3.07	2.22	145.6
	N 78	O 74	2.92	1.91	169.1
	N 79	O 75	2.96	1.99	161.7
	N 83	O 79	3.02	2.25	150.3
	N 80	O 48	2.90	1.91	168.1
	N 84	O 76	3.01	2.10	151.0
	N 85	O 77	2.93	1.91	167.7
	N 87	O 29	2.86	1.89	152.9
	N 89	O 33	3.19	2.18	161.7
	N 90	O 52	2.94	1.95	174.4
	N 91	O 35	2.99	2.01	161.8
	N 92	O 54	2.85	1.91	157.5
	N 93	O 37	3.02	2.03	168.0
	N 94	O 57	2.99	2.00	171.1
	N 95	O 39	2.89	2.04	141.9
	N 96	O 39	2.97	2.00	158.4
	N 97	O 101	2.55	1.53	178.0
	N 100	O 97	2.90	1.93	149.5
	N 106	O 103	3.15	2.34	128.9
	N 107	O 103	3.17	2.25	150.2
	N 108	O 104	2.82	1.85	164.7
	N 109	O 105	3.01	2.05	159.0

Bez.	Donor	Akzeptor	N....O (Å)	N-H...O (Å)	N-H...O (°)
	N 110	O 106	2.95	2.04	149.0
	N 111	O 107	3.02	2.03	153.6
	N 112	O 108	2.96	2.03	178.8
	N 113	O 109	2.85	1.95	152.8
	N 114	O 110	3.18	2.21	157.1
	N 115	O 111	3.18	2.14	163.6
	N 116	O 112	3.21	2.36	147.4
	N 117	O 113	2.69	1.76	169.6
	N 118	O 114	3.13	2.12	158.2
	N 119	O 116	3.02	2.15	146.0
	N 120	O 117	2.86	1.88	157.6
	N 121	O 118	3.23	2.30	159.1
	N 123	O 126	2.88	1.95	156.3
	N 125	O 32	3.01	2.07	164.8
	N 128	O 34	2.92	1.98	155.1
	N 129	O 154	2.83	1.91	166.7
	N 130	O 36	2.87	1.91	168.7
	N 131	O 156	2.93	1.93	163.6
	N 135	O 170	2.95	2.04	153.9
	N 137	O 168	2.94	2.19	129.4
	N 142	O 138	3.08	2.12	166.7
	N 143	O 139	2.84	1.99	152.3
	N 144	O 140	3.08	2.15	151.6
	N 145	O 141	3.10	2.11	163.4
	N 146	O 142	2.96	2.04	153.5
	N 147	O 143	2.94	1.98	162.6
	N 148	O 144	3.02	2.11	164.8
	N 149	O 145	3.07	2.05	164.1
	N 150	O 146	2.85	1.85	164.1
	N 151	O 147	2.92	2.12	139.6
	N 152	O 149	3.08	2.18	151.6
	N 154	O 127	2.99	1.98	170.0
	N 156	O 129	2.93	1.94	172.4
	N 157	O 178	2.83	1.87	166.2
	N 158	O 131	3.07	2.13	148.5
	N 159	O 180	2.99	2.13	144.6
	N 163	O 192	2.90	2.01	146.1
	N 166	O 195	2.85	1.86	168.1
	N 169	O 166	3.13	2.25	146.3
	N 170	O 135	2.72	1.73	167.2
	N 173	O 169	2.91	2.03	137.6
	N 174	O 171	3.10	2.11	162.4
	N 180	O 157	2.90	1.91	169.1
	N 181	O 201	2.92	1.95	162.5
	N 183	O 203	2.95	2.06	146.4
	N 184	O 188	2.88	1.95	153.3
	N 187	O 184	3.06	2.17	147.2
	N 189	O 262	3.07	2.10	163.4
	N 190	O 182	2.75	1.76	173.6
	N 193	O 190	3.12	2.19	154.2
	N 194	O 160	3.00	2.11	147.4
	N 195	O 164	2.96	2.02	154.9
	N 199	O 196	3.28	2.33	158.3
	N 202	O 271	2.86	2.04	138.6
	N 203	O 181	2.94	1.97	164.6
	N 205	O 183	2.73	1.74	174.8
	N 206	O 183	3.22	2.39	140.2
	N 208	O 220	2.96	1.99	161.2

Bez.	Donor	Akzeptor	N....O (Å)	N-H...O (Å)	N-H...O (°)
	N 210	O 210	3.08	2.35	155.7
	N 212	O 216	2.88	1.95	151.8
	N 218	O 210	3.06	2.12	155.1
	N 220	O 208	3.08	2.15	153.4
	N 222	O 205	2.68	1.70	166.0
	N 225	O 222	3.07	2.19	145.7
	N 227	O 223	3.08	2.12	159.6
	N 229	O 226	3.04	2.27	132.3
	N 230	O 226	3.25	2.32	153.9
	N 231	O 227	2.96	1.99	161.8
	N 232	O 228	2.87	1.93	156.3
	N 233	O 229	2.94	2.07	143.8
	N 234	O 230	2.93	1.97	160.0
	N 235	O 231	3.02	2.06	160.0
	N 236	O 232	2.98	2.04	155.8
	N 237	O 233	2.87	1.92	157.8
	N 238	O 234	2.85	1.89	158.6
	N 239	O 235	3.12	2.14	164.6
	N 240	O 236	3.18	2.33	141.8
	N 241	O 238	2.92	2.34	144.1
	N 242	O 237	3.10	2.17	154.7
	N 247	O 244	3.21	2.47	135.6
	N 248	O 244	2.83	2.30	112.1
	N 251	O 247	2.96	1.98	166.1
	N 252	O 248	2.79	1.86	153.2
	N 253	O 249	3.03	2.12	150.5
	N 254	O 250	2.90	1.99	150.9
	N 255	O 251	2.92	2.10	138.3
	N 256	O 252	2.98	2.02	160.0
	N 257	O 272	2.91	1.99	153.1
	N 259	O 270	2.93	1.93	177.8
	N 262	O 187	2.92	2.03	147.5
	N 268	O 265	3.13	2.24	146.6
	N 272	O 257	2.93	1.96	161.2
	N 273	O 202	2.99	1.99	174.5
	N 275	O 13	2.78	1.87	149.9

Die in den folgenden Tabellen aufgeführten intermolekularen H-Brücken Kontakte zu symmetrieverwandten Molekülen sind jeweils in Klammern mit einem Index versehen, der sich entsprechend auf die folgenden Symmetrieoperationen bezieht.

1. X, Y, Z
2. -X, -Y, 1/2+Z
3. 1/2-Y, 1/2+X, 3/4+Z
4. 1/2+Y, 1/2-X, 1/4+Z
5. Y, X, -Z
6. -Y, -X, 1/2-Z
7. 1/2-X, 1/2+Y, 3/4-Z
8. 1/2+X, 1/2-Y, 1/4-Z

Tabelle 11.2 B Wasserstoffbrückenkontakte zwischen Seitenketten und Hauptketten Atomen

Seitenketten-atom		Hauptketten-atom		H-Brücken-Abstand (Å)
OE1	3	O	81	2.85
NE1	8	O	207	3.17
NE1	8	O	206	2.89
NH1	12	O	15	2.84
OG	14	N	24	3.01
OG	15	O	17	2.76
OH	23	O	84	2.65
OD1	26	N	28	2.98
OE2	27	N	1	2.83
OE1	27	N	1	3.03
OG	33	O	30	2.59
OG1	40	N	70	2.95
OE1	43	N	214	3.19
OE2	43	N	214	2.89
OE1	43	N	215	2.84
ND1	46	O	212	3.28
OE1	48	N	81	2.67
OE1	48	N	80	3.22
NH2	52	O	78	2.98
NH2	52	O	86	3.02
NH1	52	O	88	2.95
NH1	52	O	78	2.86
OH	59	O	109	3.29
OH	60	O	95	2.94
OG	62	N	64	3.02
OD1	65	N	68	2.91
OD2	65	N	71	3.02
OD1	65	N	67	3.04
ND2	67	O	98	2.97
OD1	67	N	69	2.91
OG1	71	N	43	2.83
NE2	72	O	218	3.00
OG	79	N	83	3.30
OG	79	O	75	2.74
N2	86	O	80	2.91
N2	86	O	83	2.81
OG1	88	O	33	3.15
NE2	89	O	52	3.02

Seitenketten-atom		Hauptketten-atom		H-Brucken-Abstand (Å)
N2	94	O	40	2.80
N2	94	O	96	2.82
OD2	97	N	101	2.98
OD2	97	N	99	2.70
OD2	97	N	100	3.06
OD1	98	N	66	2.81
OH	104	N	136	3.23
OH	104	N	135	3.08
OH	104	O	136	2.69
N2	118	O	151	2.69
ND2	119	O	116	3.10
NH1	121	O	279 (4)	2.99
OG	132	O	224	2.78
OG	138	N	141	3.09
OE1	149	N	155	2.93
NE2	149	O	245	3.32
OG	150	O	147	2.90
OG	151	O	148	2.73
OD1	161	N	223	2.85
OD2	165	N	167	2.92
OG	173	O	169	2.69
OE1	174	N	176	3.09
OG1	179	O	172	2.72
OD1	184	N	188	3.06
OD1	184	N	186	2.98
NH2	185	O	206	2.90
NH1	188	O	241 (4)	2.97
NE	189	O	263	2.90
NH1	189	O	193	2.76
OG	190	N	183	3.29
OG	190	O	183	3.14
ND2	194	N	163	3.12
ND2	194	N	164	2.81
ND2	194	N	162	2.97
OD1	200	N	179	2.76
OG	210	O	72	2.74
OG1	211	O	71	2.81
OG	216	O	213	2.76
NH1	218	O	167 (8)	3.13
OG	221	N	207	2.88
OG	223	N	160	3.01
OG1	227	O	223	2.88
OH	236	N	26	2.93
NH1	250	O	247	2.62
OG1	255	O	251	2.77
NZ	258	O	254	3.02
NZ	258	O	256	2.83
ND2	263	O	189	3.03
OG1	268	N	196	2.83
ND2	270	O	261	2.71
OD1	270	N	261	2.95
OD1	275	N	277	3.11
ND2	275	O	24	3.02
ND2	276	O	255	2.82
OH	277	N	1	3.35

Tabelle 11.2 C Wasserstoffbrückenkontakte von Seitenketten zu anderen Seitenketten und zu Wassermolekülen (OW)

Atom		Atom		H-Brücken Abstand (Å)
OE1	3	OW61		3.23
		OH	61 (3)	3.35
ND2	3	NZ	86	2.65
OG1	4	OW52		2.99
OG1	4	OW111		3.32
NH2	12	OD1	187	2.90
NH2	12	OD1	260	3.15
NE	12	OD2	187	2.95
OG	17	OW53		3.13
OG1	20	OW60		2.74
OG	21	OW111		2.70
OG1	22	OW111		2.70
OH	23	OW51		2.79
OH	24	OD1	122 (7)	3.14
OH	25	OW47		2.76
OH	25	OW159		2.73
OD1	26	OG	28	2.57
OD2	26	OW114		3.02
OE2	27	OW114		2.60
OE1	27	OW43		2.94
OG	28	OW7		2.59
OG	33	OG1	88	2.86
OH	36	OD2	117	2.60
OD2	39	ND1	69	2.68
OD1	39	OW29		2.61
OG1	40	OD1	65	2.78
OE2	43	OW81		2.50
OE1	43	OW78		2.75
OG	45	OW78		2.88
OE2	48	OG1	81	2.71
		OW128		3.06
OE1	48	OG1	81	3.35
OE1	50	NH2	52	2.87
OE1	50	NE	52	3.25
NH2	52	OE1	50	2.87
OE1	54	NE2	89	3.15
		OW177		2.88
OH	59	OW165		2.65
OH	61	OE1	3 (4)	3.37
OD2	65	OG1	71	2.50
OD1	65	OG1	40	2.78
ND2	69	OG	224	3.03
ND1	69	OD2	39	2.68
OG1	71	OD2	65	2.50
ND1	72	OW25		2.84
OG1	88	OE2	48	2.71
OH	82	OW128		2.87
NZ	86	NE2	3	2.65
OG1	88	OG	33	2.86
NE2	89	OE1	54	3.10
NZ	94	OD1	98	2.93
OD1	98	NZ	94	2.93

Atom		Atom			H-Brücken Abstand (Å)
OD2	98	OW92			2.63
OD1	98	OW92			2.96
ND2	99	OW102			2.72
OD2	112	NE	147		3.13
OD2	112	OW23			2.81
OD2	112	NH1	147		3.01
		OW41			2.35
OG	116	OW59			2.96
OG	116	OW107			2.66
OD2	117	NH2	121		3.34
OD1	117	NH2	121		2.89
OD2	117	NE	121		2.84
OD2	117	OH	36		2.60
OD1	117	OD1	120		3.04
NZ	118	OW8			2.74
		OW131			2.91
ND2	119	OW59			2.71
ND2	120	OD1	117		2.96
NE	121	OD2	117		2.84
NH2	121	OD2	117		3.34
		OW177			2.55
		OW135			3.26
NH2	121	OD1	117		2.89
OD1	122	OH	24	(7)	3.14
NZ	125	OW150			3.10
OG	130	OW75			2.62
OG	132	OW75			2.80
OG	138	OW39			2.76
ND2	142	OG	173		3.08
		OW143			3.29
OD1	142	OG	170		2.69
OG	143	NH2	147		3.17
		OW132			2.92
		OW117			2.82
		OW149			3.21
NH2	147	OW105			3.08
NE	147	OD2	112		3.13
NH1	147	OD2	112		3.01
NH2	147	OG	143		3.17
		OW132			3.14
NE2	149	OW133			2.93
OE1	149	OW16			2.91
OD1	161	OG1	223		2.72
ND2	161	OW36			2.73
ND2	162	OD1	194		3.05
OD1	163	OW94			3.20
OD1	163	NH1	189		2.89
ND2	163	OD2	254	(4)	3.10
OD2	165	OW82			2.52
OD1	165	OW86			2.58
ND2	168	OW98			3.12
OD1	168	OW101			2.99
		NH1	218	(4)	3.01
OG	170	OD1	142		2.69
OG	173	ND2	142		3.08
OE1	174	OG	176		2.77

Atom		Atom		H-Brücken Abstand (Å)
OE2	174	OW80		2.80
		OW110		2.77
OG	176	OW69		3.04
OG	176	OE1	174	2.77
OG1	179	OW4		2.74
OG	183	OW72		2.72
OD2	184	OW34		2.54
OD2	184	NH2	188	3.12
OD2	184	OW89		2.53
OD2	184	NE	188	2.92
NH2	185	OG	207	2.88
NH1	185	OW88		2.48
NH2	185	OW88		3.23
NE	185	OG	207	3.17
OD2	187	OW72		2.95
OD1	187	NH2	12	2.90
		OW168		2.65
OD2	187	NE	12	2.95
NE	188	OD2	184	2.92
NH2	188	OD2	184	3.12
NH1	188	OW141		3.35
NH1	189	OD1	163	2.89
OG	190	OG1	206	2.78
OD1	194	ND2	162	3.05
OH	195	OW37		3.26
		OW120		2.52
OH	195	OW94		3.09
		OW140		3.00
OG	197	OW86		3.28
OG	197	OW79		2.63
OG1	206	OG	190	2.78
OG1	206	OW106		2.61
OG	207	NH2	185	2.88
OG	207	OW113		2.95
OG	207	NE	185	3.17
NE1	212	OW118		3.04
OG	216	OW101		2.79
OG1	217	OW153		3.12
NH2	218	OW109		2.87
		OW35		3.32
NH1	218	OW101		3.28
OG	219	OW154		2.66
OG	224	OW38		2.86
OG	224	NE2	69	3.03
OH	236	OW174		2.72
OG1	239	OW7		3.27
OG1	243	OG	247	3.08
OG1	243	OW46		2.78
OG1	244	OG	247	3.07
OG1	244	OW138		3.33
OG	247	OG1	244	3.07
OG	247	OW46		3.09
OG	247	OG1	243	3.08
NH1	250	OW46		3.10
NH2	250	OW46		2.77
NE	250	OD1	254	3.25

Atom		Atom			H-Brücken Abstand (Å)
OH	251	OW134			2.79
		OW87			2.97
OD1	254	NE	250		3.25
		ND2	163	(3)	3.30
OD2	254	OW94			3.10
OD2	254	OW157			3.24
OD1	257	OW58			2.93
ND2	257	OW9			2.52
		OW136			2.87
OD2	260	OW170			3.09
OD1	260	OW13			2.49
OD1	260	NH2	12		3.15
		OW136			3.28
OD1	260	OW170			3.25
OD2	260	OW13			2.54
OG1	268	OW83			2.66
OD1	270	OW18			2.84
OH	274	OW151			2.66
ND2	275	OW51			2.96
OD1	276	OW129			3.26
OH	277	OW114			3.18

Tabelle 11.2 D H-Brückenkontakte der Wassermoleküle. Die partiell besetzten Wassermoleküle sind mit einem Stern versehen. Am Ende der Tabelle befindet sich die Koordination des Ca^{2+}-Ions.

Atom	Atom		Abstand (Å)
OW1	O	175	3.00
	OW124		3.34
	OD2	200	3.20
	OW3		2.96
OW2	O	177	2.80
	OW124		2.72
	OW14		2.79
	OW15		2.90
OW3	O	198	2.68
	OW1		2.96
OW4	O	174	2.78
	O	177	2.85
	OG1	179	2.75
	OD1	200	3.08
OW5	O	124	2.88
OW6	OW178		2.81
OW7	OG	28	2.59
	N	29	3.27
	N	30	2.95
	O	236	2.96
	OG1	239	3.27
OW8	NZ	118	2.74
	O	151	3.27
OW9	ND2	257	2.52
	OW11		3.18
OW10	OW151		2.36
OW11	N	258	2.65
	OW136		3.02
	OW9		3.18
OW12	O	150	3.07
	OW55		2.63
	OW149		2.82
OW13	O	16	2.44
	OD2	260	2.54
	OD1	260	2.49
	OW170		2.45
*OW14	OW2		2.79
	OW56		2.90
OW15	O	176	2.82
	OW2		2.90
OW16	OE1	149	2.91
	O	155	3.08
	OW57		2.79
OW17	O	279	2.53
	OW135		2.52
OW18	O	257	2.76
	N	259	3.30
	OD1	270	2.84
OW19	O	19	3.11
OW20	OW127		3.10
	O	6	2.69
OW21	N	9	2.84
	OW70		2.74
	OW74		2.70
OW22	OG1	76	2.98
	O	82	2.74
	O	209	2.77
	OW70		2.87
OW23	OD2	112	2.81
	O	144	2.78
OW24	O	196	2.69
	O	199	2.72
	N	269	3.06
OW25	ND1	72	2.84
	OG1	76	2.95
OW26	N	58	3.11
OW27	O	37	2.85
	N	41	3.01
OW29	O	38	2.87
	OD1	39	2.61
	O	130	3.18
	N	132	2.93
	OW75		2.86
OW30	O	173	2.76
OW31	OW91		2.90
OW32	O	133	2.82
	O	158	2.66
	N	172	3.19
OW33	N	219	3.06
	O	137	3.15
	OW91		2.63
OW34	OD2	184	2.54
	O	189	2.97
	OW89		2.41
OW35	O	167	2.66
	NH2	218	3.32

Atom	Atom		Abstand (Å)
	NH1	218	3.23
	OW118		3.36
OW36	ND2	161	2.73
	N	224	2.98
	OG	224	2.86
	OW172		2.78
OW37	OH	195	3.26
	OW140		2.64
OW38	OW94		2.76
	OW163		2.53
OW39	OG	138	2.76
OW41	OD1	112	2.35
	O	151	3.33
	NZ	118	3.17
OW42	N	1	3.30
	OW169		3.26
OW43	OE1	27	2.94
OW44	OW131		2.99
OW45	N	62	2.66
	OW92		2.65
OW46	OG1	243	2.78
	OG	247	3.09
	NH2	250	2.77
	NH1	250	3.10
OW47	O	2	3.30
	OH	25	2.76
OW48	OG1	255	2.81
	O	274	2.87
	OW134		2.81
OW49	N	127	3.01
	O	152	2.67
	OW139		3.07
OW50	N	122	2.99
	OW160		3.23
OW51	OH	23	2.79
	ND2	275	2.96
OW52	OG1	4	2.99
	OG	105	3.38
	OW111		3.35
OW53	OG	17	3.13
OW54	O	252	2.75
	N	274	2.87

Atom	Atom		Abstand (Å)
	O	274	2.89
OW55	O	149	2.93
	OW12		2.63
*OW56	OW14		2.90
OW57	O	245	2.92
	N	249	2.93
	OW16		2.79
	OW104		3.19
OW58	O	12	2.98
	OD1	257	2.93
	O	273	2.67
OW59	OG	116	2.96
	O	109	2.67
	ND2	119	2.71
	OW65		2.92
OW60	O	17	2.88
	N	20	3.13
	OG1	20	2.74
	OW68		2.85
OW61	OE1	3	3.23
	O	4	2.98
	O	5	3.08
*OW62	OW67		2.63
	OW157		2.89
OW63	OW69		2.71
OW64	O	230	3.30
OW65	O	44	2.58
	N	53	3.01
	O	53	2.97
OW67	OW127		2.86
	OW123		2.86
	OW158		2.58
OW68	O	8	2.89
	OW60		2.85
	OW108		2.45
	OW127		3.30
OW69	O	146	2.82
	OG	176	3.04
	OW63		2.71
OW70	OW21		2.74
	OW22		2.87
OW71	N	55	2.89
OW72	OG	183	2.72

Atom	Atom		Abstand (Å)
	O	184	2.74
	OD2	187	2.95
OW73	N	8	3.09
OW74	O	207	2.86
	N	209	2.95
	OW21		2.70
OW75	OG	130	2.62
	OG	132	2.80
	OW29		2.86
OW77	N	44	2.96
	N	45	3.00
	OG	45	3.34
OW78	OE1	43	2.75
	OG	45	2.88
OW79	OG	197	2.63
*OW80	ND2	142	3.03
	OE2	174	2.83
*OW81	OE2	43	2.50
	O	65	3.19
OW82	OD2	165	2.52
	N	197	3.29
	N	198	3.29
OW83	O	266	2.81
	N	268	3.35
	OG1	268	2.66
OW84	OW154		2.70
OW86	OD1	165	2.58
	N	197	3.03
	OW82		3.19
OW87	N	263	3.35
	OH	251	2.97
	OW161		3.03
OW88	NH2	185	3.23
	NH1	185	2.48
OW89	OD2	184	2.53
	OW34		2.41
	OW106		2.97
OW90	O	217	3.20
	N	137	3.03
	O	168	2.84
	OW101		2.81
OW91	OW31		2.90
	OW33		2.63

Atom	Atom		Abstand (Å)
	N	139	3.00
OW92	O	64	2.59
	OW45		2.65
	OD2	98	2.63
	OD1	98	2.96
OW93	N	161	2.95
*OW94	OD1	163	3.20
	OD2	254	3.10
	OH	195	3.09
	OW38		2.76
OW95	N	98	3.33
OW97	O	66	3.16
OW98	O	165	2.86
	ND2	168	2.99
OW99	N	105	3.28
OW100	OW176		3.26
OW101	OD1	168	3.12
	OG	216	3.07
	O	217	2.79
	NH1	218	3.28
	NE		3.05
	OW90		2.81
OW102	ND2	99	2.72
OW103	OE1	174	2.87
OW104	O	246	3.32
	N	250	3.19
	OW57		3.18
OW105	O	140	2.76
	NH2	147	3.08
	NH1	147	3.04
OW106	N	191	3.30
	OG1	206	2.61
	OW89		2.97
OW107	OG	116	2.66
OW108	N	19	2.92
	O	185	2.83
	OW68		2.45
OW109	NH2	218	2.87
OW110	OW155		2.68
	OE2	174	2.77
OW111	N	5	2.87

Atom	Atom		Abstand (Å)
	OG	21	2.89
	OG1	22	2.70
	OW52		3.35
OW112	OW129		2.93
OW113	OG	207	2.95
OW114	OD2	26	3.02
	OE2	27	2.60
	OH	277	3.18
OW115	O	132	2.71
OW116	O	11	3.12
	OG1	20	2.40
	O	22	2.75
OW117	OG	143	2.82
	O	143	2.80
	OW132		3.19
OW118	NE1	212	3.04
	OW35		3.36
OW119	N	270	3.10
*OW120	OH	195	2.52
	OW94		2.40
	OW126		2.91
	OW140		3.21
OW121	OW167		3.19
	O	42	2.70
	O	63	3.02
OW122	O	186	2.66
* OW123	OD2	200	2.93
OW124	OW2		2.72
	O	175	3.35
	OW1		3.30
OW125	N	32	3.23
OW126	OW120		2.91
	O	162	3.10
	O	163	2.40
OW127	O	20	2.57
	OW20		3.10
	OW68		3.30
OW128	OE2	48	3.06
	OH	82	2.87
OW129	OD1	276	3.26
	OW112		2.93

Atom	Atom		Abstand (Å)
OW130	N	16	2.76
OW131	O	119	2.91
	OW44		2.99
	OW165		3.29
OW132	OG	143	2.92
	NH2	147	3.14
	O	150	2.86
	OW117		3.19
OW133	NE2	149	2.93
	O	246	2.82
OW134	OH	251	2.79
	OW48		2.81
OW135	O	56	3.02
	NH2	121	3.26
	OW17		2.52
OW136	ND2	257	2.87
	OD1	260	3.28
	OW11		3.02
	OW13		2.48
OW137	O	258	3.16
OW138	OG1	244	3.33
OW139	N	245	3.14
	OW49		3.07
	OW162		2.66
OW140	OW120		3.21
	OH	195	3.00
	OW37		2.64
OW141	NH1	188	3.35
OW142	O	238	3.05
	O	243	2.57
	OW162		3.18
*OW143	OH	137	2.69
	ND2	142	3.29
	OW80		2.24
	OW155		2.45
OW145	O	105	2.70
OW146	OE2	50	2.53
OW147	O	260	2.71
OW148	O	261	3.14
	N	263	3.35
	N	264	3.30
	OW161		2.89

Atom	Atom		Abstand (Å)
OW149	OG	143	3.21
	O	150	2.46
	OW12		2.82
	OW132		2.73
OW150	NZ	125	3.10
OW151	OH	274	2.66
OW153	OG1	217	3.12
OW154	OG	219	2.66
	OW84		2.70
OW155	OW110		2.68
	OW143		2.45
	O	139	2.90
OW156	N	104	2.97
OW157	OD2	254	3.24
	OW56		2.40
	OW62		2.89
*OW158	OW67		2.58
OW159	OH	25	2.73
OW160	O	122	2.74
	OW50		3.23
OW161	OW148		2.89
	N	263	2.91
	OW87		3.03
OW162	O	125	2.75
	OW139		2.66
	OW142		3.18
OW163	OW38		2.53
	O	254	3.22
OW164	O	51	3.25
	O	53	2.52
OW165	OH	59	2.65
	OW39		2.92
	OW131		3.29
OW166	OW90		2.61
	O	168	2.93
*OW167	N	65	2.87
	OW81		2.46
	OW121		3.14
OW168	OD1	187	2.65
	O	260	2.88
	OW170		3.14

Atom	Atom		Abstand (Å)
OW169	OW42		3.26
	ND2	120	3.11
	OD1	120	3.30
OW170	O	16	3.35
	OD2	260	3.09
	OD1	260	3.25
	OW13		2.45
	OW168		3.13
OW172	OW36		2.78
OW173	O	112	2.75
OW174	OH	236	2.72
	O	275	2.82
OW175	O	84	2.50
	N	86	3.06
OW176	O	161	2.81
	OW100		3.26
OW177	O	161	2.81
	OE1	54	2.88
	NH2	121	3.21
	NH1	121	2.55
OW178	O	121	3.16
	N	123	2.99
	OW6		2.81
OW179	OE1	50	2.64
	O	86	2.78
OW180	N	266	2.85

Koordination des Ca^{2+}-Ions

Ca^{2+}	OD2	200	2.70
	OD1	200	2.48
	O	171	2.41
	O	177	2.46
Ca^{2+}	OW1		2.51
	OW2		2.42
	OW3		2.47
	OW4		2.44
OW1	OW2		2.99
OW3	OW4		3.05
OW2	O	177	2.80
OW1	OW3		2.96

Tabelle 11.3 Atomkoordinaten

Die orthogonalen Koordinaten sind in Å-Einheiten angegeben. Hinter den Koordinaten folgt der isotrope Temperaturfaktor B, die Atomnummer, der Typ der Aminosäure im Drei-Buchstaben-Symbol, die Nummer der Aminosäure in der Sequenz und die Atombezeichnung.(siehe Abb. 11.1);
Das Atom mit der Bezeichnung CD2 würde nach Abb. 11.1 entsprechend als $C_{\delta}2$ bezeichnet.

| X | Y | Z | B | | |

-10.455	11.706	-17.765	15.400	1	ALA	1	N
-9.354	13.420	-16.330	14.050	2	ALA	1	CB
-9.278	12.003	-16.858	14.730	3	ALA	1	CA
-9.216	10.952	-15.759	14.920	4	ALA	1	C
-10.182	10.257	-15.447	14.680	5	ALA	1	O
-8.041	10.826	-15.158	13.890	6	ALA	2	N
-7.422	8.505	-14.627	13.500	7	ALA	2	CB
-7.853	9.853	-14.093	14.130	8	ALA	2	CA
-6.827	10.413	-13.103	14.250	9	ALA	2	C
-5.791	10.950	-13.531	15.310	10	ALA	2	O
-7.208	10.277	-11.860	11.370	11	GLN	3	N
-6.318	12.949	-6.338	8.430	12	GLN	3	NE2
-8.054	13.107	-7.710	10.890	13	GLN	3	OE1
-6.915	12.736	-7.463	9.670	14	GLN	3	CD
-6.283	11.913	-8.559	9.200	15	GLN	3	CG
-7.130	11.545	-9.741	9.500	16	GLN	3	CB
-6.362	10.658	-10.739	10.630	17	GLN	3	CA
-5.912	9.362	-10.079	11.220	18	GLN	3	C
-6.695	8.654	-9.463	11.120	19	GLN	3	O
-4.623	9.107	-10.149	11.700	20	THR	4	N
-1.639	8.607	-10.168	14.480	21	THR	4	CG2
-2.656	6.384	-10.850	18.000	22	THR	4	OG1
-2.797	7.764	-10.621	14.270	23	THR	4	CB
-4.025	7.879	-9.569	12.470	24	THR	4	CA
-3.764	8.068	-8.119	11.930	25	THR	4	C
-3.566	9.224	-7.661	11.650	26	THR	4	O
-3.747	7.031	-7.282	12.860	27	ASN	5	N
-1.431	5.280	-6.557	21.650	28	ASN	5	ND2
0.143	6.478	-5.565	23.690	29	ASN	5	OD1
-1.065	6.350	-5.867	20.130	30	ASN	5	CG
-2.051	7.400	-5.468	16.910	31	ASN	5	CB
-3.518	7.169	-5.830	13.890	32	ASN	5	CA
-4.412	8.244	-5.184	12.970	33	ASN	5	C
-4.026	9.055	-4.299	13.410	34	ASN	5	O
-5.664	8.304	-5.600	11.400	35	ALA	6	N
-7.872	9.162	-6.035	10.640	36	ALA	6	CB
-6.670	9.195	-5.062	10.460	37	ALA	6	CA
-7.108	8.737	-3.689	9.220	38	ALA	6	C
-7.033	7.541	-3.341	10.100	39	ALA	6	O
-7.611	9.665	-2.888	9.410	40	PRO	7	N
-8.272	11.713	-1.899	9.660	41	PRO	7	CG
-7.656	11.116	-3.126	9.920	42	PRO	7	CD
-8.925	10.608	-1.120	8.680	43	PRO	7	CB
-8.309	9.316	-1.622	8.370	44	PRO	7	CA
-9.352	8.267	-1.915	7.910	45	PRO	7	C
-9.989	8.341	-3.015	8.140	46	PRO	7	O
-9.555	7.316	-1.007	7.390	47	TRP	8	N
-12.822	5.414	1.147	7.530	48	TRP	8	CD2
-13.743	4.821	0.292	8.470	49	TRP	8	CE3
-15.061	4.696	0.721	8.300	50	TRP	8	CZ3
-15.476	5.222	1.939	7.470	51	TRP	8	CH2
-14.564	5.824	2.812	7.640	52	TRP	8	CZ2
-13.248	5.892	2.402	7.610	53	TRP	8	CE2
-12.147	6.382	3.070	7.840	54	TRP	8	NE1
-11.049	6.271	2.231	8.450	55	TRP	8	CD1
-11.390	5.650	1.058	7.410	56	TRP	8	CG
-10.535	5.252	-0.080	6.970	57	TRP	8	CB
-10.459	6.200	-1.259	7.010	58	TRP	8	CA
-11.892	6.615	-1.693	6.080	59	TRP	8	C
-12.476	5.906	-2.510	6.000	60	TRP	8	O

-12.425	7.396	-1.117	6.700	61	GLY	9	N
-13.831	8.078	-1.437	5.390	62	GLY	9	CA
-13.985	8.549	-2.875	6.140	63	GLY	9	C
-15.046	8.308	-3.482	6.660	64	GLY	9	O
-13.002	9.274	-3.402	5.720	65	LEU	10	N
-13.208	12.573	-4.387	8.810	66	LEU	10	CD2
-10.829	12.894	-5.013	7.970	67	LEU	10	CD1
-11.807	11.916	-4.372	7.630	68	LEU	10	CG
-11.948	10.630	-5.172	7.210	69	LEU	10	CB
-13.064	9.663	-4.824	6.430	70	LEU	10	CA
-13.011	8.390	-5.675	7.990	71	LEU	10	C
-13.767	8.257	-6.657	9.180	72	LEU	10	O
-12.097	7.469	-5.332	8.070	73	ALA	11	N
-10.983	5.246	-5.682	8.100	74	ALA	11	CB
-12.058	6.216	-6.147	8.090	75	ALA	11	CA
-13.419	5.505	-6.129	8.060	76	ALA	11	C
-13.919	4.920	-7.112	9.700	77	ALA	11	O
-14.039	5.529	-4.964	7.250	78	ARG	12	N
-18.974	-0.032	-4.186	7.930	79	ARG	12	NH2
-17.928	1.615	-5.416	6.130	80	ARG	12	NH1
-18.101	1.010	-4.250	6.760	81	ARG	12	CZ
-17.394	1.332	-3.174	7.420	82	ARG	12	NE
-16.320	2.315	-3.244	7.390	83	ARG	12	CD
-16.861	3.732	-3.061	7.360	84	ARG	12	CG
-15.696	4.757	-3.223	7.320	85	ARG	12	CB
-15.236	4.755	-4.692	8.030	86	ARG	12	CA
-16.389	5.246	-5.582	8.570	87	ARG	12	C
-17.115	4.436	-6.134	8.720	88	ARG	12	O
-16.473	6.560	-5.682	9.350	89	ILE	13	N
-19.080	10.072	-4.478	18.620	90	ILE	13	CD1
-18.417	8.690	-4.769	14.930	91	ILE	13	CG1
-17.488	8.694	-6.012	13.460	92	ILE	13	CB
-17.732	9.735	-7.095	15.690	93	ILE	13	CG2
-17.548	7.181	-6.493	10.790	94	ILE	13	CA
-17.439	6.966	-7.972	9.250	95	ILE	13	C
-18.360	7.281	-8.721	8.240	96	ILE	13	O
-16.279	6.509	-8.472	8.140	97	SER	14	N
-13.623	6.695	-9.955	9.680	98	SER	14	OG
-14.902	7.118	-10.439	9.240	99	SER	14	CB
-16.065	6.290	-9.911	8.890	100	SER	14	CA
-15.885	4.797	-10.163	9.140	101	SER	14	C
-15.395	4.443	-11.247	10.470	102	SER	14	O
-16.274	3.960	-9.220	10.160	103	SER	15	N
-14.737	0.613	-8.649	13.600	104	SER	15	OG
-14.956	2.001	-8.471	12.190	105	SER	15	CB
-16.127	2.502	-9.347	11.560	106	SER	15	CA
-17.409	1.793	-8.958	11.980	107	SER	15	C
-18.248	2.215	-8.169	11.180	108	SER	15	O
-17.506	0.607	-9.535	13.850	109	THR	16	N
-18.396	-2.432	-10.713	16.680	110	THR	16	CG2
-20.080	-0.571	-11.185	18.140	111	THR	16	OG1
-18.793	-0.992	-10.714	16.550	112	THR	16	CB
-18.615	-0.316	-9.269	14.930	113	THR	16	CA
-18.305	-1.196	-8.086	15.860	114	THR	16	C
-19.168	-1.758	-7.390	16.050	115	THR	16	O
-17.039	-1.234	-7.695	15.890	116	SER	17	N
-15.946	-4.103	-7.675	22.220	117	SER	17	OG
-15.321	-2.879	-7.394	17.300	118	SER	17	CB
-16.429	-2.033	-6.654	15.740	119	SER	17	CA
-15.606	-1.271	-5.631	13.780	120	SER	17	C

-14.951	-0.337	-6.068	12.730	121	SER	17	O
-15.593	-1.728	-4.398	13.080	122	PRO	18	N
-15.812	-3.067	-2.459	12.550	123	PRO	18	CG
-16.392	-2.834	-3.857	12.770	124	PRO	18	CD
-15.135	-1.788	-2.067	12.460	125	PRO	18	CB
-14.673	-1.184	-3.384	12.930	126	PRO	18	CA
-13.233	-1.585	-3.713	12.630	127	PRO	18	C
-13.015	-2.420	-4.607	13.330	128	PRO	18	O
-12.290	-0.989	-3.039	13.310	129	GLY	19	N
-10.878	-1.265	-3.134	13.020	130	GLY	19	CA
-10.049	-0.743	-4.273	13.220	131	GLY	19	C
-8.867	-1.161	-4.385	13.230	132	GLY	19	O
-10.564	0.090	-5.137	12.880	133	THR	20	N
-11.309	-0.368	-8.010	13.590	134	THR	20	CG2
-11.541	1.989	-7.215	13.130	135	THR	20	OG1
-10.609	0.900	-7.534	13.850	136	THR	20	CB
-9.745	0.700	-6.234	13.070	137	THR	20	CA
-9.110	1.990	-5.745	12.930	138	THR	20	C
-9.518	2.524	-4.701	13.110	139	THR	20	O
-8.122	2.494	-6.441	13.880	140	SER	21	N
-5.377	2.604	-6.765	18.050	141	SER	21	OG
-5.906	3.297	-5.625	16.300	142	SER	21	CB
-7.363	3.670	-6.013	14.340	143	SER	21	CA
-7.286	4.775	-7.031	13.530	144	SER	21	C
-6.573	5.738	-6.715	13.570	145	SER	21	O
-7.897	4.653	-8.183	11.720	146	THR	22	N
-7.632	6.163	-11.728	13.430	147	THR	22	CG2
-6.181	4.577	-10.493	14.010	148	THR	22	OG1
-7.546	5.116	-10.633	13.150	149	THR	22	CB
-7.952	5.653	-9.210	11.400	150	THR	22	CA
-9.366	6.283	-9.320	10.430	151	THR	22	C
-10.374	5.581	-9.330	10.900	152	THR	22	O
-9.343	7.606	-9.360	9.170	153	TYR	23	N
-14.919	13.244	-9.383	9.940	154	TYR	23	OH
-11.555	11.996	-8.832	8.560	155	TYR	23	CD2
-12.618	12.895	-8.969	8.860	156	TYR	23	CE2
-13.891	12.348	-9.223	9.210	157	TYR	23	CZ
-14.107	10.989	-9.276	8.320	158	TYR	23	CE1
-13.020	10.116	-9.068	8.550	159	TYR	23	CD1
-11.727	10.624	-8.883	8.260	160	TYR	23	CG
-10.570	9.663	-8.654	8.000	161	TYR	23	CB
-10.583	8.411	-9.532	8.810	162	TYR	23	CA
-10.702	8.769	-11.008	10.190	163	TYR	23	C
-9.852	9.500	-11.544	9.930	164	TYR	23	O
-11.704	8.233	-11.692	11.300	165	TYR	24	N
-8.931	2.661	-13.374	20.520	166	TYR	24	OH
-11.537	5.109	-12.805	17.930	167	TYR	24	CD2
-10.729	3.986	-12.652	18.350	168	TYR	24	CE2
-9.685	3.809	-13.544	18.620	169	TYR	24	CZ
-9.437	4.732	-14.543	18.690	170	TYR	24	CE1
-10.246	5.866	-14.686	18.110	171	TYR	24	CD1
-11.318	6.067	-13.807	16.470	172	TYR	24	CG
-12.251	7.241	-13.906	13.870	173	TYR	24	CB
-11.905	8.494	-13.126	11.620	174	TYR	24	CA
-13.034	9.513	-13.239	10.590	175	TYR	24	C
-14.058	9.297	-12.556	11.370	176	TYR	24	O
-12.839	10.508	-14.045	9.510	177	TYR	25	N
-8.705	15.215	-12.688	13.760	178	TYR	25	OH
-11.287	12.701	-12.273	10.000	179	TYR	25	CD2
-10.054	13.334	-12.258	10.130	180	TYR	25	CE2
-9.934	14.603	-12.765	11.890	181	TYR	25	CZ
-11.025	15.237	-13.376	11.860	182	TYR	25	CE1
-12.255	14.557	-13.439	10.390	183	TYR	25	CD1
-12.404	13.281	-12.894	10.200	184	TYR	25	CG
-13.724	12.537	-12.950	9.490	185	TYR	25	CB
-13.826	11.592	-14.179	10.130	186	TYR	25	CA
-13.619	12.316	-15.490	9.940	187	TYR	25	C
-12.540	12.240	-16.099	9.290	188	TYR	25	O
-14.711	12.948	-15.953	10.060	189	ASP	26	N
-16.040	14.114	-19.940	14.100	190	ASP	26	OD2
-16.103	16.056	-18.996	12.660	191	ASP	26	OD1
-16.071	14.840	-18.920	11.750	192	ASP	26	CG
-16.111	14.107	-17.591	11.970	193	ASP	26	CB
-14.662	13.811	-17.129	10.550	194	ASP	26	CA
-13.902	15.090	-16.796	11.190	195	ASP	26	C
-14.125	15.713	-15.734	11.210	196	ASP	26	O
-13.070	15.568	-17.734	11.890	197	GLU	27	N
-11.643	13.656	-19.379	20.040	198	GLU	27	OE2
-9.485	13.942	-19.503	22.560	199	GLU	27	OE1
-10.654	14.406	-19.421	19.790	200	GLU	27	CD
-10.948	15.836	-19.555	17.820	201	GLU	27	CG
-11.206	16.855	-18.648	14.550	202	GLU	27	CB
-12.225	16.734	-17.485	12.170	203	GLU	27	CA
-12.976	18.026	-17.357	10.980	204	GLU	27	C
-12.401	18.996	-16.867	11.400	205	GLU	27	O
-14.262	18.013	-17.699	10.490	206	SER	28	N
-17.117	17.865	-17.479	11.200	207	SER	28	OG
-16.538	19.022	-18.013	9.450	208	SER	28	CB
-15.120	19.214	-17.521	9.930	209	SER	28	CA
-15.076	19.615	-16.056	8.070	210	SER	28	C
-15.056	20.790	-15.716	8.440	211	SER	28	O
-15.058	18.569	-15.226	7.210	212	ALA	29	N
-13.296	18.895	-13.616	9.030	213	ALA	29	CB
-14.815	18.660	-13.782	7.050	214	ALA	29	CA
-15.622	19.701	-13.057	7.170	215	ALA	29	C
-15.148	20.387	-12.121	7.250	216	ALA	29	O
-16.886	19.933	-13.394	6.720	217	GLY	30	N
-17.704	20.907	-12.695	6.490	218	GLY	30	CA
-17.476	22.344	-13.111	7.190	219	GLY	30	C
-18.090	23.220	-12.454	7.350	220	GLY	30	O
-16.681	22.636	-14.145	8.750	221	GLN	31	N
-14.635	23.385	-19.028	25.650	222	GLN	31	NE2
-13.579	24.822	-17.589	24.520	223	GLN	31	OE1
-14.475	24.012	-17.849	23.440	224	GLN	31	CD
-15.538	23.562	-16.836	20.360	225	GLN	31	CG
-15.429	24.318	-15.551	15.240	226	GLN	31	CB
-16.477	24.057	-14.504	10.890	227	GLN	31	CA
-17.834	24.658	-14.915	10.990	228	GLN	31	C
-18.596	24.015	-15.663	10.550	229	GLN	31	O
-18.087	25.868	-14.443	9.880	230	GLY	32	N
-19.375	26.512	-14.839	10.000	231	GLY	32	CA
-20.429	26.389	-13.743	8.430	232	GLY	32	C
-21.356	27.187	-13.798	8.770	233	GLY	32	O
-20.236	25.480	-12.844	8.310	234	SER	33	N
-20.070	23.239	-10.792	9.320	235	SER	33	OG
-21.256	23.821	-11.350	8.350	236	SER	33	CB
-21.117	25.295	-11.674	8.590	237	SER	33	CA
-20.535	26.051	-10.459	8.420	238	SER	33	C
-19.333	26.363	-10.411	8.120	239	SER	33	O
-21.409	26.256	-9.466	7.100	240	CYS	34	N

-21.077	29.390	-9.481	10.340	241	CYS	34	SG
-21.504	28.336	-8.076	9.140	242	CYS	34	CB
-21.022	26.906	-8.220	7.710	243	CYS	34	CA
-21.513	26.092	-7.022	6.580	244	CYS	34	C
-22.644	25.595	-7.081	8.200	245	CYS	34	O
-20.688	25.973	-6.000	5.400	246	VAL	35	N
-20.495	22.971	-5.784	5.000	247	VAL	35	CG2
-20.830	23.219	-3.304	4.920	248	VAL	35	CG1
-20.384	23.908	-4.589	6.050	249	VAL	35	CB
-21.137	25.257	-4.784	5.550	250	VAL	35	CA
-20.961	26.175	-3.586	5.620	251	VAL	35	C
-19.818	26.603	-3.307	5.390	252	VAL	35	O
-22.052	26.410	-2.868	5.190	253	TYR	36	N
-24.179	32.546	-4.463	9.060	254	TYR	36	OH
-23.978	29.035	-3.521	6.610	255	TYR	36	CD2
-24.219	30.186	-4.300	6.760	256	TYR	36	CE2
-23.972	31.419	-3.715	6.470	257	TYR	36	CZ
-23.539	31.548	-2.402	6.350	258	TYR	36	CE1
-23.277	30.402	-1.650	6.140	259	TYR	36	CD1
-23.520	29.139	-2.214	5.700	260	TYR	36	CG
-23.322	27.899	-1.365	4.960	261	TYR	36	CB
-22.008	27.167	-1.599	4.620	262	TYR	36	CA
-21.742	26.173	-0.454	5.800	263	TYR	36	C
-22.494	25.204	-0.329	6.480	264	TYR	36	O
-20.703	26.411	0.297	4.840	265	VAL	37	N
-18.438	24.400	0.266	6.460	266	VAL	37	CG2
-18.686	24.158	2.703	7.380	267	VAL	37	CG1
-18.941	25.090	1.515	5.410	268	VAL	37	CB
-20.407	25.563	1.489	5.040	269	VAL	37	CA
-20.821	26.395	2.709	5.100	270	VAL	37	C
-20.201	27.435	2.995	5.950	271	VAL	37	O
-21.891	25.988	3.336	5.730	272	ILE	38	N
-25.911	27.138	2.584	9.490	273	ILE	38	CD1
-24.424	27.305	3.010	8.310	274	ILE	38	CG1
-24.034	26.711	4.377	7.110	275	ILE	38	CB
-24.762	27.493	5.307	6.750	276	ILE	38	CG2
-22.474	26.692	4.504	5.620	277	ILE	38	CA
-21.974	25.981	5.761	5.950	278	ILE	38	C
-22.480	24.907	6.109	5.230	279	ILE	38	O
-21.020	26.634	6.438	5.520	280	ASP	39	N
-18.319	23.790	8.455	6.160	281	ASP	39	OD2
-19.439	22.515	7.122	6.980	282	ASP	39	OD1
-19.056	23.647	7.464	5.930	283	ASP	39	CG
-19.400	24.897	6.710	5.290	284	ASP	39	CB
-20.260	25.916	7.481	5.430	285	ASP	39	CA
-19.489	26.908	8.367	5.420	286	ASP	39	C
-19.989	28.004	8.649	6.100	287	ASP	39	O
-18.286	26.574	8.766	5.610	288	THR	40	N
-17.216	25.522	11.377	7.190	289	THR	40	CG2
-15.534	25.863	9.575	5.310	290	THR	40	OG1
-16.451	26.518	10.513	5.420	291	THR	40	CB
-17.418	27.397	9.609	5.400	292	THR	40	CA
-16.594	28.380	8.804	6.670	293	THR	40	C
-15.747	29.112	9.418	7.730	294	THR	40	O
-16.732	28.356	7.497	6.360	295	GLY	41	N
-15.934	29.206	6.579	7.180	296	GLY	41	CA
-14.992	28.359	5.723	7.740	297	GLY	41	C
-15.038	27.118	5.784	7.450	298	GLY	41	O
-14.188	29.012	4.884	7.570	299	ILE	42	N
-15.645	27.828	0.889	10.320	300	ILE	42	CD1
-15.189	27.729	2.399	9.850	301	ILE	42	CG1
-13.728	28.286	2.504	9.340	302	ILE	42	CB
-12.715	27.503	1.636	9.700	303	ILE	42	CG2
-13.280	28.344	3.987	7.780	304	ILE	42	CA
-11.935	29.099	4.012	8.080	305	ILE	42	C
-12.021	30.359	3.982	8.890	306	ILE	42	O
-10.865	28.348	4.162	7.890	307	GLU	43	N
-6.080	28.397	6.741	9.580	308	GLU	43	OE2
-5.262	27.379	4.989	11.040	309	GLU	43	OE1
-6.023	28.171	5.537	8.920	310	GLU	43	CD
-7.038	28.972	4.765	8.540	311	GLU	43	CG
-8.430	28.297	4.742	7.950	312	GLU	43	CB
-9.539	29.039	4.045	7.560	313	GLU	43	CA
-9.282	29.170	2.556	8.150	314	GLU	43	C
-8.688	28.310	1.910	8.040	315	GLU	43	O
-9.746	30.320	2.019	8.900	316	ALA	44	N
-10.488	31.779	0.141	10.740	317	ALA	44	CB
-9.706	30.515	0.544	11.040	318	ALA	44	CA
-8.305	30.588	-0.032	10.490	319	ALA	44	C
-8.184	30.309	-1.249	12.120	320	ALA	44	O
-7.316	30.898	0.777	11.160	321	SER	45	N
-4.976	31.204	2.530	16.030	322	SER	45	OG
-5.104	31.863	1.277	12.940	323	SER	45	CB
-5.920	31.000	0.308	11.720	324	SER	45	CA
-5.211	29.669	0.211	10.770	325	SER	45	C
-4.030	29.676	-0.127	11.440	326	SER	45	O
-5.861	28.567	0.615	9.010	327	HIS	46	N
-4.701	24.118	0.570	7.430	328	HIS	46	CD2
-4.247	23.054	1.292	9.440	329	HIS	46	NE2
-4.710	23.149	2.520	8.370	330	HIS	46	CE1
-5.412	24.271	2.638	9.880	331	HIS	46	ND1
-5.417	24.878	1.397	8.420	332	HIS	46	CG
-6.162	26.164	1.105	8.880	333	HIS	46	CB
-5.195	27.257	0.552	8.100	334	HIS	46	CA
-4.853	26.968	-0.882	8.100	335	HIS	46	C
-5.758	27.025	-1.743	8.570	336	HIS	46	O
-3.596	26.617	-1.167	8.870	337	PRO	47	N
-1.302	26.039	-1.007	10.190	338	PRO	47	CG
-2.456	26.616	-0.208	9.820	339	PRO	47	CD
-1.736	25.820	-2.406	9.070	340	PRO	47	CB
-3.147	26.323	-2.534	8.190	341	PRO	47	CA
-4.049	25.335	-3.255	7.500	342	PRO	47	C
-4.123	25.409	-4.466	8.490	343	PRO	47	O
-4.673	24.407	-2.561	7.440	344	GLU	48	N
-3.709	19.842	-3.349	14.520	345	GLU	48	OE2
-5.865	20.074	-3.604	15.120	346	GLU	48	OE1
-4.811	20.294	-3.042	12.620	347	GLU	48	CD
-4.775	21.268	-1.874	10.610	348	GLU	48	CG
-5.853	22.333	-2.093	8.920	349	GLU	48	CB
-5.514	23.372	-3.177	7.980	350	GLU	48	CA
-6.769	23.889	-3.849	7.580	351	GLU	48	C
-7.399	23.178	-4.630	8.270	352	GLU	48	O
-7.158	25.110	-3.568	7.850	353	PHE	49	N
-9.393	26.194	-0.667	7.590	354	PHE	49	CD2
-9.977	25.438	0.345	8.510	355	PHE	49	CE2
-10.824	24.378	0.039	7.250	356	PHE	49	CZ
-11.098	24.077	-1.270	8.010	357	PHE	49	CE1
-10.559	24.830	-2.295	8.720	358	PHE	49	CD1
-9.680	25.883	-1.974	8.060	359	PHE	49	CG
-9.086	26.661	-3.119	8.450	360	PHE	49	CB

-8.351	25.765	-0.133	9.550	361	PHE	49	CA
-8.017	26.506	-5.400	9.410	362	PHE	49	C
-8.955	26.800	-6.167	9.460	363	PHE	49	O
-6.757	26.839	-5.613	9.480	364	GLU	50	N
-5.276	23.690	-9.590	13.520	365	GLU	50	OE2
-7.423	23.771	-9.171	12.360	366	GLU	50	OE1
-6.271	24.094	-8.912	13.220	367	GLU	50	CD
-5.842	25.062	-7.859	11.800	368	GLU	50	CG
-6.487	26.466	-8.058	10.910	369	GLU	50	CB
-6.295	27.429	-6.868	10.110	370	GLU	50	CA
-6.995	28.724	-7.225	9.570	371	GLU	50	C
-7.159	28.970	-8.437	10.740	372	GLU	50	O
-7.367	29.493	-6.237	9.200	373	GLY	51	N
-8.040	30.771	-6.416	9.490	374	GLY	51	CA
-9.506	30.606	-6.811	9.550	375	GLY	51	C
-10.109	31.628	-7.163	10.580	376	GLY	51	O
-10.046	29.408	-6.750	8.100	377	ARG	52	N
-9.774	23.616	-7.529	7.170	378	ARG	52	NH2
-11.947	24.344	-7.664	8.240	379	ARG	52	NH1
-10.694	24.394	-8.139	7.760	380	ARG	52	CZ
-10.317	25.256	-9.088	7.630	381	ARG	52	NE
-11.152	26.297	-9.685	7.080	382	ARG	52	CD
-10.974	27.621	-9.020	7.840	383	ARG	52	CG
-11.669	27.742	-7.689	7.810	384	ARG	52	CB
-11.454	29.131	-7.042	8.130	385	ARG	52	CA
-12.376	29.248	-5.851	8.820	386	ARG	52	C
-13.620	29.044	-6.040	9.380	387	ARG	52	O
-11.895	29.548	-4.693	8.410	388	ALA	53	N
-12.219	28.845	-2.342	9.050	389	ALA	53	CB
-12.745	29.702	-3.504	8.950	390	ALA	53	CA
-12.828	31.160	-3.060	10.260	391	ALA	53	C
-11.816	31.877	-3.178	10.050	392	ALA	53	O
-13.981	31.529	-2.501	10.230	393	GLN	54	N
-16.047	35.904	-4.303	24.990	394	GLN	54	NE2
-15.724	34.449	-6.026	25.210	395	GLN	54	OE1
-15.739	34.718	-4.820	23.340	396	GLN	54	CD
-15.428	33.543	-3.919	20.100	397	GLN	54	CG
-14.394	33.959	-2.907	15.900	398	GLN	54	CB
-14.072	32.878	-1.891	12.360	399	GLN	54	CA
-15.110	32.904	-0.775	10.630	400	GLN	54	C
-16.112	32.238	-0.990	9.960	401	GLN	54	O
-14.854	33.651	0.267	9.670	402	MET	55	N
-16.617	32.619	4.975	10.010	403	MET	55	CE
-15.547	31.913	3.726	12.190	404	MET	55	SD
-14.477	33.308	3.312	10.670	405	MET	55	CG
-15.293	34.386	2.616	10.480	406	MET	55	CB
-15.860	33.891	1.310	10.180	407	MET	55	CA
-16.840	34.936	0.749	11.630	408	MET	55	C
-16.360	35.899	0.142	12.720	409	MET	55	O
-18.111	34.745	1.000	11.120	410	VAL	56	N
-19.206	35.077	-1.987	13.300	411	VAL	56	CG2
-21.343	34.822	-0.579	15.280	412	VAL	56	CG1
-19.844	34.829	-0.628	13.500	413	VAL	56	CB
-19.144	35.662	0.471	11.670	414	VAL	56	CA
-19.956	36.223	1.592	11.520	415	VAL	56	C
-20.533	37.304	1.404	12.220	416	VAL	56	O
-19.970	35.604	2.760	10.740	417	LYS	57	N
-25.012	39.336	5.378	18.590	418	LYS	57	NZ
-24.604	37.924	5.717	16.880	419	LYS	57	CE
-23.526	37.508	4.728	15.810	420	LYS	57	CD
-23.245	36.006	4.737	14.190	421	LYS	57	CG
-22.245	35.464	3.429	12.270	422	LYS	57	CB
-20.788	36.110	3.878	11.330	423	LYS	57	CA
-20.319	35.560	5.202	11.280	424	LYS	57	C
-20.008	34.347	5.231	11.710	425	LYS	57	O
-20.184	36.325	6.258	11.160	426	THR	58	N
-18.320	35.164	9.381	10.620	427	THR	58	CG2
-18.012	37.282	7.969	15.170	428	THR	58	OG1
-18.880	36.288	8.574	12.560	429	THR	58	CB
-19.991	35.784	7.584	12.020	430	THR	58	CA
-21.180	36.266	8.484	12.200	431	THR	58	C
-21.655	37.384	8.200	13.010	432	THR	58	O
-21.375	35.543	9.569	11.760	433	TYR	59	N
-26.871	35.302	6.200	12.060	434	TYR	59	OH
-24.260	34.121	8.465	11.650	435	TYR	59	CD2
-25.049	34.268	7.326	11.940	436	TYR	59	CE2
-26.071	35.204	7.294	11.340	437	TYR	59	CZ
-26.255	36.051	8.374	11.520	438	TYR	59	CE1
-25.407	35.969	9.467	11.800	439	TYR	59	CD1
-24.408	34.982	9.532	11.240	440	TYR	59	CG
-23.497	34.929	10.750	12.330	441	TYR	59	CB
-22.321	35.929	10.600	12.510	442	TYR	59	CA
-21.621	36.173	11.928	14.130	443	TYR	59	C
-22.276	36.363	12.971	14.710	444	TYR	59	O
-20.305	36.094	11.883	15.620	445	TYR	60	N
-22.800	31.205	14.552	21.720	446	TYR	60	OH
-20.358	33.188	12.795	19.670	447	TYR	60	CD2
-21.367	32.262	13.050	20.020	448	TYR	60	CE2
-21.833	32.130	14.343	20.650	449	TYR	60	CZ
-21.315	32.904	15.387	20.150	450	TYR	60	CE1
-20.302	33.841	15.086	19.360	451	TYR	60	CD1
-19.814	33.982	13.808	18.670	452	TYR	60	CG
-18.767	35.008	13.436	18.160	453	TYR	60	CB
-19.455	36.344	13.066	17.440	454	TYR	60	CA
-18.494	37.487	12.821	18.920	455	TYR	60	C
-18.520	38.165	11.759	20.520	456	TYR	60	O
-17.592	37.774	13.744	19.360	457	TYR	61	N
-19.033	38.179	19.558	23.520	458	TYR	61	OH
-16.748	37.680	16.792	20.900	459	TYR	61	CD2
-17.525	37.465	17.913	22.210	460	TYR	61	CE2
-18.264	38.505	18.468	22.570	461	TYR	61	CZ
-18.243	39.778	17.893	22.180	462	TYR	61	CE1
-17.466	39.981	16.745	21.770	463	TYR	61	CD1
-16.702	38.931	16.201	21.150	464	TYR	61	CG
-15.871	39.127	14.944	20.750	465	TYR	61	CB
-16.717	38.946	13.658	19.800	466	TYR	61	CA
-15.752	38.852	12.482	20.030	467	TYR	61	C
-15.298	39.918	12.044	20.220	468	TYR	61	O
-15.396	37.642	12.088	19.600	469	SER	62	N
-12.265	36.655	10.363	20.670	470	SER	62	OG
-13.119	36.791	11.504	20.150	471	SER	62	CB
-14.437	37.429	11.009	19.680	472	SER	62	CA
-15.000	36.473	9.963	19.880	473	SER	62	C
-15.914	35.699	10.326	19.880	474	SER	62	O
-14.392	36.518	8.797	19.420	475	SER	63	N
-13.564	36.407	5.822	21.520	476	SER	63	OG
-14.849	36.312	6.369	20.170	477	SER	63	CB
-14.802	35.606	7.723	19.550	478	SER	63	CA
-13.903	34.393	7.684	18.940	479	SER	63	C
-14.210	33.494	6.870	19.990	480	SER	63	O

-12.879	34.331	8.327	17.660	481	ARG	64	N
-8.719	37.161	12.568	29.240	482	ARG	64	NH2
-9.840	35.152	12.642	29.280	483	ARG	64	NH1
-9.081	36.011	11.950	28.510	484	ARG	64	CZ
-8.578	35.704	10.759	26.910	485	ARG	64	NE
-8.714	34.392	10.124	25.080	486	ARG	64	CD
-10.168	33.945	10.125	22.500	487	ARG	64	CG
-10.540	33.517	8.755	19.430	488	ARG	64	CB
-11.975	33.176	8.403	16.720	489	ARG	64	CA
-12.460	31.933	9.144	13.850	490	ARG	64	C
-13.161	31.970	10.168	13.810	491	ARG	64	O
-12.052	30.805	8.541	10.690	492	ASP	65	N
-12.267	26.051	7.859	7.730	493	ASP	65	OD2
-12.978	26.943	9.755	7.910	494	ASP	65	OD1
-12.512	27.034	8.614	8.150	495	ASP	65	CG
-12.211	28.420	8.045	8.560	496	ASP	65	CB
-12.286	29.489	9.141	9.690	497	ASP	65	CA
-11.256	29.270	10.270	9.350	498	ASP	65	C
-10.066	28.982	9.986	9.920	499	ASP	65	O
-11.697	29.382	11.498	9.130	500	GLY	66	N
-10.854	29.187	12.668	9.730	501	GLY	66	CA
-10.962	27.764	13.187	9.910	502	GLY	66	C
-10.322	27.398	14.184	11.200	503	GLY	66	O
-11.769	26.954	12.539	9.490	504	ASN	67	N
-13.986	23.845	14.803	12.640	505	ASN	67	ND2
-13.891	23.082	12.661	11.350	506	ASN	67	OD1
-13.883	23.991	13.478	10.530	507	ASN	67	CG
-13.613	25.418	13.009	9.860	508	ASN	67	CB
-12.092	25.600	12.973	9.210	509	ASN	67	CA
-11.419	24.525	12.101	9.020	510	ASN	67	C
-10.664	23.712	12.638	9.740	511	ASN	67	O
-11.691	24.550	10.804	7.660	512	GLY	68	N
-11.092	23.596	9.876	6.550	513	GLY	68	CA
-12.222	22.814	9.145	5.280	514	GLY	68	C
-12.037	22.417	8.000	5.910	515	GLY	68	O
-13.311	22.617	9.851	5.840	516	HIS	69	N
-16.982	19.572	10.376	7.230	517	HIS	69	CD2
-18.229	19.275	9.930	7.120	518	HIS	69	NE2
-18.712	20.311	9.305	7.340	519	HIS	69	CE1
-17.856	21.311	9.366	6.960	520	HIS	69	ND1
-16.732	20.892	10.028	6.640	521	HIS	69	CG
-15.546	21.712	10.341	6.410	522	HIS	69	CB
-14.418	21.774	9.315	5.710	523	HIS	69	CA
-14.891	22.233	7.942	4.710	524	HIS	69	C
-14.989	21.434	7.003	4.720	525	HIS	69	O
-15.132	23.526	7.821	5.170	526	GLY	70	N
-15.654	24.148	6.576	5.620	527	GLY	70	CA
-14.670	24.000	5.432	4.780	528	GLY	70	C
-14.962	23.649	4.266	5.700	529	GLY	70	O
-13.389	24.194	5.757	4.450	530	THR	71	N
-9.735	24.236	4.512	5.900	531	THR	71	CG2
-11.114	25.945	5.641	6.290	532	THR	71	OG1
-10.934	24.527	5.407	5.990	533	THR	71	CB
-12.290	23.983	4.797	4.600	534	THR	71	CA
-12.174	22.553	4.310	4.610	535	THR	71	C
-11.943	22.285	3.103	5.070	536	THR	71	O
-12.359	21.589	5.219	5.080	537	HIS	72	N
-10.802	17.289	6.269	5.570	538	HIS	72	CD2
-10.999	15.960	5.961	5.350	539	HIS	72	NE2
-12.265	15.752	5.603	6.150	540	HIS	72	CE1
-12.930	16.930	5.664	6.630	541	HIS	72	ND1
-12.625	17.853	6.064	5.870	542	HIS	72	CG
-12.387	19.328	6.211	5.170	543	HIS	72	CB
-12.333	20.142	4.921	4.790	544	HIS	72	CA
-13.469	19.813	3.957	3.760	545	HIS	72	C
-13.198	19.232	2.904	5.190	546	HIS	72	O
-14.670	20.267	4.293	4.420	547	CYS	73	N
-17.507	19.522	5.591	7.290	548	CYS	73	SG
-17.140	20.480	4.078	5.540	549	CYS	73	CB
-15.840	19.996	3.430	5.220	550	CYS	73	CA
-15.638	20.584	2.050	3.500	551	CYS	73	C
-15.878	19.938	1.032	3.990	552	CYS	73	O
-15.248	21.873	2.031	3.320	553	ALA	74	N
-14.566	24.021	0.983	4.660	554	ALA	74	CB
-15.009	22.546	0.736	3.990	555	ALA	74	CA
-14.006	21.761	-0.066	3.900	556	ALA	74	C
-14.154	21.636	-1.308	5.110	557	ALA	74	O
-12.969	21.241	0.564	4.820	558	GLY	75	N
-11.887	20.509	-0.112	4.580	559	GLY	75	CA
-12.433	19.249	-0.786	3.790	560	GLY	75	C
-12.065	18.902	-1.921	5.110	561	GLY	75	O
-13.389	18.593	-0.143	2.840	562	THR	76	N
-15.480	15.307	-0.221	4.760	563	THR	76	CG2
-13.738	16.122	1.284	4.900	564	THR	76	OG1
-14.770	16.538	0.329	4.310	565	THR	76	CB
-14.038	17.411	-0.735	4.290	566	THR	76	CA
-14.923	17.789	-1.928	3.270	567	THR	76	C
-15.049	16.999	-2.881	4.700	568	THR	76	O
-15.547	18.961	-1.856	4.220	569	VAL	77	N
-17.762	21.135	-4.061	4.610	570	VAL	77	CG2
-18.219	20.508	-1.648	4.970	571	VAL	77	CG1
-17.163	20.673	-2.750	5.160	572	VAL	77	CB
-16.332	19.404	-3.027	4.960	573	VAL	77	CA
-15.416	19.670	-4.254	5.480	574	VAL	77	C
-15.694	19.165	-5.336	4.630	575	VAL	77	O
-14.379	20.491	-3.980	5.430	576	GLY	78	N
-13.665	20.976	-5.174	7.090	577	GLY	78	CA
-12.211	21.296	-5.055	7.270	578	GLY	78	C
-11.772	22.077	-5.935	8.690	579	GLY	78	O
-11.468	20.797	-4.113	7.500	580	SER	79	N
-9.439	19.330	-2.583	7.790	581	SER	79	OG
-9.389	20.753	-2.777	7.120	582	SER	79	CB
-9.982	21.050	-4.140	6.540	583	SER	79	CA
-9.405	20.222	-5.289	7.390	584	SER	79	C
-10.003	19.248	-5.744	6.280	585	SER	79	O
-8.210	20.625	-5.739	7.610	586	ARG	80	N
-1.060	19.073	-7.369	25.680	587	ARG	80	NH2
-1.551	21.354	-7.486	25.750	588	ARG	80	NH1
-1.922	20.082	-7.467	24.380	589	ARG	80	CZ
-3.197	19.757	-7.747	22.580	590	ARG	80	NE
-4.087	20.804	-8.254	17.940	591	ARG	80	CD
-5.447	20.155	-8.320	14.530	592	ARG	80	CG
-6.166	20.644	-7.065	10.830	593	ARG	80	CB
-7.497	19.937	-6.806	9.020	594	ARG	80	CA
-7.238	18.472	-6.496	8.010	595	ARG	80	C
-7.593	17.607	-7.298	7.660	596	ARG	80	O
-6.668	18.201	-5.329	7.450	597	THR	81	N
-4.456	15.353	-3.899	9.780	598	THR	81	CG2
-3.926	17.551	-4.782	8.720	599	THR	81	OG1
-4.952	16.793	-4.093	8.240	600	THR	81	CB

-6.267	16.840	-4.933	7.890	601	THR	81	CA
-7.371	16.015	-4.326	7.690	602	THR	81	C
-7.476	14.791	-4.536	8.500	603	THR	81	O
-8.179	16.697	-3.528	7.170	604	TYR	82	N
-3.442	16.522	0.004	11.190	605	TYR	82	OH
-6.794	17.616	-0.778	9.140	606	TYR	82	CD2
-5.428	17.634	-0.458	9.140	607	TYR	82	CE2
-4.786	16.437	-0.278	10.020	608	TYR	82	CZ
-5.460	15.212	-0.337	9.440	609	TYR	82	CE1
-6.822	15.219	-0.653	9.400	610	TYR	82	CD1
-7.504	16.429	-0.850	8.330	611	TYR	82	CG
-8.993	16.447	-1.188	8.040	612	TYR	82	CB
-9.157	15.997	-2.681	7.790	613	TYR	82	CA
-10.599	16.138	-3.111	6.650	614	TYR	82	C
-11.466	15.561	-2.435	7.330	615	TYR	82	O
-10.838	16.762	-4.241	6.770	616	GLY	83	N
-12.210	17.154	-4.600	5.510	617	GLY	83	CA
-12.801	16.368	-5.746	6.300	618	GLY	83	C
-12.110	15.869	-6.629	7.230	619	GLY	83	O
-14.153	16.327	-5.673	5.590	620	VAL	84	N
-16.387	14.454	-4.907	4.850	621	VAL	84	CG2
-17.206	14.607	-7.286	5.810	622	VAL	84	CG1
-16.373	15.263	-6.188	4.910	623	VAL	84	CB
-14.942	15.589	-6.677	6.080	624	VAL	84	CA
-14.963	16.423	-7.959	6.360	625	VAL	84	C
-14.753	15.872	-9.056	8.130	626	VAL	84	O
-15.252	17.677	-7.812	6.430	627	ALA	85	N
-16.915	19.106	-8.874	10.580	628	ALA	85	CB
-15.472	18.579	-8.979	8.640	629	ALA	85	CA
-14.372	19.628	-8.963	6.860	630	ALA	85	C
-14.527	20.692	-8.380	6.430	631	ALA	85	O
-13.303	19.222	-9.679	7.680	632	LYS	86	N
-9.500	15.423	-7.555	7.600	633	LYS	86	NZ
-9.679	15.455	-9.032	8.540	634	LYS	86	CE
-9.687	16.809	-9.653	8.410	635	LYS	86	CD
-10.657	17.805	-9.021	7.280	636	LYS	86	CG
-10.887	19.004	-9.960	7.080	637	LYS	86	CB
-12.015	19.927	-9.470	7.160	638	LYS	86	CA
-11.957	21.310	-10.075	8.560	639	LYS	86	C
-10.959	22.042	-9.823	8.090	640	LYS	86	O
-12.936	21.700	-10.878	8.240	641	LYS	87	N
-10.057	22.450	-16.757	20.180	642	LYS	87	NZ
-10.037	21.753	-15.419	17.630	643	LYS	87	CE
-11.483	21.860	-14.892	15.330	644	LYS	87	CD
-11.506	22.210	-13.426	11.750	645	LYS	87	CG
-12.816	22.890	-13.041	9.950	646	LYS	87	CB
-12.944	22.009	-11.534	8.300	647	LYS	87	CA
-14.136	22.844	-11.146	8.960	648	LYS	87	C
-14.320	24.920	-11.764	8.610	649	LYS	87	O
-14.891	23.403	-10.114	7.440	650	THR	88	N
-16.382	23.044	-7.399	10.150	651	THR	88	CG2
-18.286	23.949	-8.671	10.020	652	THR	88	OG1
-16.987	23.283	-8.770	8.960	653	THR	88	CB
-16.034	24.191	-9.662	7.960	654	THR	88	CA
-15.634	25.449	-8.913	7.640	655	THR	88	C
-14.488	25.618	-8.465	7.100	656	THR	88	O
-16.579	26.393	-8.807	6.990	657	GLN	89	N
-15.576	31.316	-6.421	18.000	658	GLN	89	NE2
-15.354	31.331	-8.651	20.210	659	GLN	89	OE1
-15.950	30.894	-7.638	17.930	660	GLN	89	CD
-17.170	30.043	-7.784	15.400	661	GLN	89	CG
-17.072	28.846	-8.709	11.500	662	GLN	89	CB
-16.408	27.631	-8.039	8.710	663	GLN	89	CA
-16.959	27.420	-6.625	8.240	664	GLN	89	C
-18.091	26.969	-6.512	8.730	665	GLN	89	O
-16.235	27.771	-5.600	7.430	666	LEU	90	N
-16.334	24.425	-3.413	9.660	667	LEU	90	CD2
-13.896	25.032	-3.423	11.070	668	LEU	90	CD1
-15.292	25.407	-3.906	9.340	669	LEU	90	CG
-15.607	26.822	-3.398	8.140	670	LEU	90	CB
-16.674	27.596	-4.222	8.040	671	LEU	90	CA
-16.972	28.929	-3.559	7.780	672	LEU	90	C
-16.116	29.826	-3.666	8.680	673	LEU	90	O
-18.081	28.986	-2.825	6.630	674	PHE	91	N
-18.730	32.242	-4.500	10.520	675	PHE	91	CD2
-18.699	32.638	-5.859	10.690	676	PHE	91	CE2
-19.645	32.113	-6.736	10.830	677	PHE	91	CZ
-20.606	31.193	-6.319	11.670	678	PHE	91	CE1
-20.577	30.748	-4.972	9.890	679	PHE	91	CD1
-19.656	31.280	-4.084	8.940	680	PHE	91	CG
-19.724	30.853	-2.666	8.070	681	PHE	91	CB
-18.469	30.189	-2.100	7.050	682	PHE	91	CA
-18.702	29.810	-0.647	7.620	683	PHE	91	C
-19.456	28.859	-0.394	7.010	684	PHE	91	O
-18.036	30.536	0.247	6.210	685	GLY	92	N
-18.175	30.152	1.675	6.930	686	GLY	92	CA
-19.151	31.079	2.388	6.490	687	GLY	92	C
-19.155	32.310	2.198	7.020	688	GLY	92	O
-19.987	30.438	3.184	6.590	689	VAL	93	N
-22.564	31.279	2.088	8.270	690	VAL	93	CG2
-23.364	31.769	4.438	8.450	691	VAL	93	CG1
-22.403	30.952	3.575	7.350	692	VAL	93	CB
-20.963	31.152	4.046	7.410	693	VAL	93	CA
-20.699	30.680	5.474	7.440	694	VAL	93	C
-20.889	29.513	5.744	7.110	695	VAL	93	O
-20.252	31.576	6.338	7.180	696	LYS	94	N
-16.347	30.553	11.740	7.930	697	LYS	94	NZ
-16.468	32.026	11.434	7.490	698	LYS	94	CE
-16.852	32.244	9.993	6.210	699	LYS	94	CD
-18.178	31.549	9.617	6.440	700	LYS	94	CG
-18.602	31.864	8.186	7.130	701	LYS	94	CB
-19.874	31.146	7.706	7.140	702	LYS	94	CA
-21.072	31.358	8.639	6.950	703	LYS	94	C
-21.373	32.485	9.109	8.560	704	LYS	94	O
-21.758	30.270	8.895	6.090	705	VAL	95	N
-23.909	28.064	8.959	7.460	706	VAL	95	CG2
-24.670	30.195	7.890	7.750	707	VAL	95	CG1
-24.156	29.575	9.171	7.470	708	VAL	95	CB
-22.900	30.258	9.790	6.800	709	VAL	95	CA
-22.491	29.617	11.120	6.730	710	VAL	95	C
-23.305	29.711	12.070	8.110	711	VAL	95	O
-21.382	28.886	11.116	7.260	712	LEU	96	N
-22.916	25.864	12.445	10.830	713	LEU	96	CD2
-21.242	24.390	11.274	10.430	714	LEU	96	CD1
-21.733	25.826	11.486	10.440	715	LEU	96	CG
-20.588	26.709	11.981	9.770	716	LEU	96	CB
-20.910	28.184	12.315	9.130	717	LEU	96	CA
-19.729	28.940	12.923	9.100	718	LEU	96	C
-18.906	29.442	12.179	9.620	719	LEU	96	O
-19.706	28.985	14.247	10.710	720	ASP	97	N

-18.544	27.940	17.100	15.770	721	ASP	97	OD2
-17.800	29.264	18.309	17.260	722	ASP	97	OD1
-19.127	29.013	17.284	14.650	723	ASP	97	CG
-18.984	30.139	16.270	13.260	724	ASP	97	CB
-18.548	29.661	14.896	12.160	725	ASP	97	CA
-17.311	28.775	14.802	12.260	726	ASP	97	C
-17.321	27.677	14.207	12.160	727	ASP	97	O
-16.199	29.278	15.364	12.600	728	ASP	98	N
-13.012	31.501	14.682	13.440	729	ASP	98	OD2
-13.819	30.164	13.166	13.580	730	ASP	98	OD1
-13.507	30.414	14.353	12.780	731	ASP	98	CG
-13.691	29.412	15.445	13.180	732	ASP	98	CB
-14.928	28.530	15.296	12.910	733	ASP	98	CA
-14.941	27.323	16.238	13.420	734	ASP	98	C
-13.999	26.504	16.124	13.360	735	ASP	98	O
-15.953	27.185	17.051	14.040	736	ASN	99	N
-15.842	28.157	20.636	22.310	737	ASN	99	ND2
-14.343	26.561	20.018	21.500	738	ASN	99	OD1
-15.515	27.005	20.030	20.820	739	ASN	99	CG
-16.626	26.301	19.250	18.480	740	ASN	99	CB
-16.113	25.963	17.842	16.240	741	ASN	99	CA
-16.958	24.953	17.087	16.530	742	ASN	99	C
-17.173	23.843	17.571	17.830	743	ASN	99	O
-17.460	25.346	15.933	15.740	744	GLY	100	N
-18.358	24.573	15.088	15.180	745	GLY	100	CA
-19.802	24.670	15.498	15.210	746	GLY	100	C
-20.575	23.797	15.042	16.100	747	GLY	100	O
-20.178	25.578	16.332	15.830	748	SER	101	N
-20.857	25.284	18.949	22.180	749	SER	101	OG
-21.646	26.212	18.244	18.380	750	SER	101	CB
-21.578	25.803	16.769	17.480	751	SER	101	CA
-22.240	26.941	16.010	16.530	752	SER	101	C
-21.590	27.849	15.544	15.850	753	SER	101	O
-23.559	26.892	15.940	17.280	754	GLY	102	N
-24.367	27.964	15.303	16.310	755	GLY	102	CA
-25.766	27.860	15.941	16.070	756	GLY	102	C
-26.154	26.764	16.380	17.410	757	GLY	102	O
-26.468	28.949	16.011	15.020	758	ALA	103	N
-28.189	30.367	17.037	15.220	759	ALA	103	CB
-27.871	28.997	16.445	14.440	760	ALA	103	CA
-28.685	28.738	15.171	12.930	761	ALA	103	C
-28.200	29.057	14.072	11.600	762	ALA	103	O
-29.861	28.207	15.331	12.600	763	TYR	104	N
-31.359	21.486	14.526	16.080	764	TYR	104	OH
-32.737	24.795	15.192	14.620	765	TYR	104	CD2
-32.609	23.389	15.166	15.950	766	TYR	104	CE2
-31.452	22.837	14.602	15.680	767	TYR	104	CZ
-30.449	23.640	14.075	15.450	768	TYR	104	CE1
-30.590	25.029	14.144	15.020	769	TYR	104	CD1
-31.723	25.607	14.705	13.810	770	TYR	104	CG
-31.910	27.119	14.668	12.990	771	TYR	104	CB
-30.710	27.890	14.166	11.730	772	TYR	104	CA
-31.070	29.154	13.404	11.540	773	TYR	104	C
-31.041	29.136	12.167	11.020	774	TYR	104	O
-31.348	30.266	14.123	11.500	775	SER	105	N
-31.017	32.905	15.170	17.030	776	SER	105	OG
-32.122	32.601	14.359	15.840	777	SER	105	CB
-31.706	31.503	13.388	11.870	778	SER	105	CA
-30.586	31.925	12.462	10.930	779	SER	105	C
-30.921	32.427	11.354	11.230	780	SER	105	O
-29.303	31.731	12.813	10.070	781	THR	106	N
-27.004	32.582	14.065	14.340	782	THR	106	CG2
-25.821	32.213	11.855	16.710	783	THR	106	OG1
-26.979	32.700	12.571	12.910	784	THR	106	CB
-28.242	32.134	11.868	10.740	785	THR	106	CA
-28.042	31.149	10.741	9.190	786	THR	106	C
-27.739	31.565	9.592	8.060	787	THR	106	O
-28.301	29.848	11.005	8.020	788	ILE	107	N
-28.919	25.963	8.374	16.450	789	ILE	107	CD1
-28.954	26.476	9.855	12.950	790	ILE	107	CG1
-27.832	27.462	10.148	11.720	791	ILE	107	CB
-27.066	27.278	11.462	11.020	792	ILE	107	CG2
-28.233	28.943	9.841	8.720	793	ILE	107	CA
-29.408	29.228	8.926	7.560	794	ILE	107	C
-29.182	29.178	7.690	7.450	795	ILE	107	O
-30.594	29.530	9.412	6.630	796	ILE	108	N
-34.508	28.881	11.083	7.200	797	ILE	108	CD1
-33.541	28.772	9.891	6.450	798	ILE	108	CG1
-33.051	30.107	9.284	6.570	799	ILE	108	CB
-34.100	30.746	8.316	6.490	800	ILE	108	CG2
-31.703	29.874	8.526	6.260	801	ILE	108	CA
-31.360	31.105	7.684	5.840	802	ILE	108	C
-31.525	31.064	6.476	5.590	803	ILE	108	O
-30.818	32.106	8.366	5.600	804	ALA	109	N
-29.923	34.427	8.529	6.630	805	ALA	109	CB
-30.410	33.339	7.614	6.210	806	ALA	109	CA
-29.408	33.014	6.511	6.160	807	ALA	109	C
-29.549	33.564	5.388	5.610	808	ALA	109	O
-28.468	32.102	6.782	5.930	809	GLY	110	N
-27.424	31.717	5.826	6.300	810	GLY	110	CA
-28.050	31.040	4.622	5.870	811	GLY	110	C
-27.641	31.266	3.481	6.480	812	GLY	110	O
-29.068	30.215	4.857	6.370	813	MET	111	N
-31.300	25.933	6.784	12.050	814	MET	111	CE
-31.094	25.920	5.035	11.880	815	MET	111	SD
-29.939	27.352	4.860	8.290	816	MET	111	CG
-30.726	28.452	4.206	7.990	817	MET	111	CB
-29.791	29.570	3.729	6.690	818	MET	111	CA
-30.557	30.609	2.883	6.890	819	MET	111	C
-30.485	30.587	1.638	6.790	820	MET	111	O
-31.298	31.495	3.557	7.500	821	ASP	112	N
-34.565	31.764	3.878	13.990	822	ASP	112	OD2
-34.397	33.143	5.561	14.040	823	ASP	112	OD1
-34.027	32.716	4.449	12.280	824	ASP	112	CG
-32.897	33.408	3.731	10.260	825	ASP	112	CB
-32.045	32.545	2.799	8.090	826	ASP	112	CA
-31.067	33.383	1.977	7.120	827	ASP	112	C
-31.382	33.815	0.859	7.370	828	ASP	112	O
-29.884	33.626	2.558	6.440	829	PHE	113	N
-26.481	36.739	1.939	10.190	830	PHE	113	CD2
-25.420	37.315	1.231	10.540	831	PHE	113	CE2
-24.429	36.484	0.685	11.250	832	PHE	113	CZ
-24.499	35.084	0.853	10.500	833	PHE	113	CE1
-25.547	34.541	1.567	10.270	834	PHE	113	CD1
-26.540	35.353	2.121	8.140	835	PHE	113	CG
-27.689	34.717	2.850	7.580	836	PHE	113	CB
-28.873	34.455	1.891	7.270	837	PHE	113	CA
-28.461	33.822	0.570	6.350	838	PHE	113	C
-28.380	34.474	-0.488	6.220	839	PHE	113	O
-28.198	32.495	0.600	6.310	840	VAL	114	N

-27.067	29.587	-1.665	5.410	841	VAL	114	CG2
-26.253	30.207	0.650	7.820	842	VAL	114	CG1
-27.379	30.311	-0.348	6.300	843	VAL	114	CB
-27.766	31.792	-0.627	6.080	844	VAL	114	CA
-28.826	31.877	-1.730	5.580	845	VAL	114	C
-28.503	32.084	-2.895	6.220	846	VAL	114	O
-30.075	31.704	-1.311	5.890	847	ALA	115	N
-32.550	31.548	-1.590	6.660	848	ALA	115	CB
-31.194	31.730	-2.285	6.570	849	ALA	115	CA
-31.193	33.037	-3.076	6.030	850	ALA	115	C
-31.475	33.030	-4.286	7.350	851	ALA	115	O
-30.828	34.124	-2.390	5.460	852	SER	116	N
-30.922	37.840	-2.538	7.740	853	SER	116	OG
-30.971	36.537	-1.961	7.720	854	SER	116	CB
-30.761	35.439	-3.005	6.600	855	SER	116	CA
-29.455	35.670	-3.747	7.660	856	SER	116	C
-29.471	36.177	-4.892	7.860	857	SER	116	O
-28.365	35.398	-3.016	7.190	858	ASP	117	N
-23.818	34.850	-3.314	8.230	859	ASP	117	OD2
-24.255	36.960	-2.958	9.240	860	ASP	117	OD1
-24.555	35.753	-2.905	8.180	861	ASP	117	CG
-25.975	35.374	-2.468	7.580	862	ASP	117	CB
-27.031	35.699	-3.547	7.240	863	ASP	117	CA
-26.747	35.023	-4.883	7.680	864	ASP	117	C
-25.964	35.603	-5.687	8.730	865	ASP	117	O
-27.260	33.851	-5.157	7.920	866	LYS	118	N
-32.000	30.709	-7.832	17.610	867	LYS	118	NZ
-31.487	30.935	-6.485	14.010	868	LYS	118	CE
-29.959	30.610	-6.545	14.180	869	LYS	118	CD
-29.156	31.862	-6.518	11.860	870	LYS	118	CG
-27.612	31.703	-6.427	10.510	871	LYS	118	CB
-26.971	33.086	-6.376	9.860	872	LYS	118	CA
-27.420	33.896	-7.593	11.680	873	LYS	118	C
-26.912	33.745	-8.708	12.240	874	LYS	118	O
-28.414	34.782	-7.357	12.570	875	ASN	119	N
-31.993	35.452	-6.597	16.360	876	ASN	119	ND2
-31.702	34.514	-8.596	16.320	877	ASN	119	OD1
-31.346	35.390	-7.764	16.380	878	ASN	119	CG
-30.242	36.285	-8.187	14.590	879	ASN	119	CB
-28.889	35.627	-8.468	14.480	880	ASN	119	CA
-27.818	36.652	-8.849	15.630	881	ASN	119	C
-28.024	37.271	-9.923	17.460	882	ASN	119	O
-26.813	36.959	-8.057	15.880	883	ASN	120	N
-24.640	38.647	-5.355	22.810	884	ASN	120	ND2
-26.759	39.371	-5.781	24.470	885	ASN	120	OD1
-25.625	39.017	-6.170	22.490	886	ASN	120	CG
-25.489	39.064	-7.640	20.440	887	ASN	120	CB
-25.786	37.896	-8.529	17.850	888	ASN	120	CA
-24.477	37.180	-8.922	17.210	889	ASN	120	C
-23.459	37.906	-8.962	17.850	890	ASN	120	O
-24.545	35.892	-9.204	15.680	891	ARG	121	N
-21.430	37.173	-3.550	11.860	892	ARG	121	NH2
-20.049	37.023	-5.383	13.920	893	ARG	121	NH1
-21.156	36.634	-4.721	12.210	894	ARG	121	CZ
-21.946	35.736	-5.258	13.010	895	ARG	121	NE
-21.765	35.152	-6.581	13.900	896	ARG	121	CD
-22.911	34.355	-7.057	13.890	897	ARG	121	CG
-22.973	34.051	-8.529	13.950	898	ARG	121	CB
-23.297	35.143	-9.514	14.830	899	ARG	121	CA
-23.494	34.552	-10.899	15.080	900	ARG	121	C
-22.589	34.301	-11.348	14.120	901	ARG	121	O
-22.375	34.369	-11.573	16.820	902	ASN	122	N
-21.777	33.611	-16.010	22.760	903	ASN	122	ND2
-22.832	35.489	-15.312	24.010	904	ASN	122	OD1
-22.023	34.564	-15.154	22.040	905	ASN	122	CG
-21.336	34.437	-13.797	20.210	906	ASN	122	CB
-22.313	33.694	-12.882	17.600	907	ASN	122	CA
-21.939	32.206	-12.696	16.160	908	ASN	122	C
-20.797	31.778	-12.528	15.690	909	ASN	122	O
-23.029	31.453	-12.701	14.130	910	CYS	123	N
-22.734	30.570	-9.792	12.130	911	CYS	123	SG
-23.650	29.716	-11.113	12.210	912	CYS	123	CB
-23.083	30.015	-12.520	13.000	913	CYS	123	CA
-23.909	29.381	-13.627	13.110	914	CYS	123	C
-24.963	28.748	-13.373	13.040	915	CYS	123	O
-23.432	29.493	-14.864	12.480	916	PRO	124	N
-21.941	29.568	-16.666	13.090	917	PRO	124	CG
-22.118	30.046	-15.251	12.760	918	PRO	124	CD
-23.272	29.176	-17.217	13.050	919	PRO	124	CB
-24.192	29.004	-16.016	12.620	920	PRO	124	CA
-24.676	27.567	-15.913	12.370	921	PRO	124	C
-25.755	27.223	-16.445	13.310	922	PRO	124	O
-23.916	26.680	-15.297	11.470	923	LYS	125	N
-22.565	24.993	-19.764	20.320	924	LYS	125	NZ
-21.928	23.970	-18.908	18.210	925	LYS	125	CE
-22.860	23.838	-17.660	16.840	926	LYS	125	CD
-22.194	24.551	-16.484	14.340	927	LYS	125	CG
-23.010	24.394	-15.207	13.440	928	LYS	125	CB
-24.273	25.270	-15.209	11.910	929	LYS	125	CA
-25.106	24.952	-13.960	11.140	930	LYS	125	C
-25.482	23.777	-13.858	11.870	931	LYS	125	O
-25.333	25.906	-13.074	10.060	932	GLY	126	N
-26.188	25.588	-11.909	8.720	933	GLY	126	CA
-25.458	25.789	-10.594	8.510	934	GLY	126	C
-24.249	26.000	-10.523	8.680	935	GLY	126	O
-26.259	25.657	-9.534	7.780	936	VAL	127	N
-26.218	28.428	-8.756	8.580	937	VAL	127	CG2
-26.082	27.759	-6.356	8.130	938	VAL	127	CG1
-26.486	27.349	-7.733	7.620	939	VAL	127	CB
-25.872	25.983	-8.165	7.450	940	VAL	127	CA
-26.255	24.885	-7.172	6.980	941	VAL	127	C
-27.365	24.342	-7.270	6.630	942	VAL	127	O
-25.285	24.619	-6.312	6.090	943	VAL	128	N
-24.603	21.924	-7.000	5.740	944	VAL	128	CG2
-24.341	21.385	-4.537	6.450	945	VAL	128	CG1
-24.354	22.460	-5.604	5.050	946	VAL	128	CB
-25.386	23.588	-5.271	5.620	947	VAL	128	CA
-25.130	24.217	-3.904	4.920	948	VAL	128	C
-24.381	25.188	-3.857	6.160	949	VAL	128	O
-25.771	23.724	-2.867	4.290	950	ALA	129	N
-26.542	24.911	-0.786	5.640	951	ALA	129	CB
-25.477	24.122	-1.492	5.600	952	ALA	129	CA
-25.201	22.822	-0.686	7.110	953	ALA	129	C
-25.955	21.862	-0.814	7.940	954	ALA	129	O
-24.108	22.864	0.053	6.490	955	SER	130	N
-21.866	20.123	1.036	8.860	956	SER	130	OG
-22.259	21.329	0.413	7.010	957	SER	130	CB
-23.670	21.711	0.859	6.490	958	SER	130	CA
-23.715	22.106	2.316	5.710	959	SER	130	C
-23.087	23.100	2.695	5.560	960	SER	130	O

-24.540	21.404	3.081	6.350	961	LEU	131	N
-27.547	24.249	5.577	12.450	962	LEU	131	CD2
-27.534	23.487	3.017	11.200	963	LEU	131	CD1
-26.649	23.521	4.245	9.800	964	LEU	131	CG
-26.290	22.101	4.696	8.890	965	LEU	131	CB
-24.815	21.707	4.481	6.440	966	LEU	131	CA
-24.430	20.528	5.380	5.870	967	LEU	131	C
-25.266	19.637	5.589	6.950	968	LEU	131	O
-23.201	20.556	5.850	6.730	969	SER	132	N
-21.089	18.623	5.160	6.350	970	SER	132	OG
-21.231	19.170	6.468	6.470	971	SER	132	CB
-22.692	19.502	6.744	5.920	972	SER	132	CA
-22.873	19.962	8.173	7.140	973	SER	132	C
-21.909	20.205	8.927	7.620	974	SER	132	O
-24.122	20.067	8.550	7.860	975	LEU	133	N
-26.716	22.598	9.040	13.480	976	LEU	133	CD2
-24.735	23.806	8.154	13.960	977	LEU	133	CD1
-25.297	23.074	9.341	12.800	978	LEU	133	CG
-24.395	22.011	9.926	10.340	979	LEU	133	CB
-24.550	20.502	9.867	8.990	980	LEU	133	CA
-25.963	19.983	10.145	10.040	981	LEU	133	C
-26.684	19.503	9.266	9.970	982	LEU	133	O
-26.380	20.155	11.396	11.340	983	GLY	134	N
-27.795	19.804	11.748	11.230	984	GLY	134	CA
-27.888	19.706	13.267	11.960	985	GLY	134	C
-26.848	19.730	13.953	13.610	986	GLY	134	O
-29.052	19.592	13.785	11.010	987	GLY	135	N
-29.312	19.404	15.223	10.880	988	GLY	135	CA
-30.695	18.734	15.309	9.550	989	GLY	135	C
-31.161	18.128	14.363	8.910	990	GLY	135	O
-31.294	18.910	16.475	11.070	991	GLY	136	N
-32.614	18.280	16.754	10.160	992	GLY	136	CA
-33.650	18.865	15.791	9.440	993	GLY	136	C
-33.457	19.949	15.203	10.690	994	GLY	136	O
-34.733	18.177	15.611	9.130	995	TYR	137	N
-41.151	19.046	11.343	13.320	996	TYR	137	OH
-39.152	18.777	14.364	10.430	997	TYR	137	CD2
-40.170	19.141	13.491	10.820	998	TYR	137	CE2
-40.141	18.676	12.184	11.490	999	TYR	137	CZ
-39.150	17.792	11.759	11.080	1000	TYR	137	CE1
-38.111	17.482	12.641	9.560	1001	TYR	137	CD1
-38.129	17.896	13.955	9.540	1002	TYR	137	CG
-37.019	17.541	14.922	9.940	1003	TYR	137	CB
-35.816	18.551	14.719	9.060	1004	TYR	137	CA
-36.285	19.987	14.940	8.710	1005	TYR	137	C
-36.536	20.425	16.090	9.740	1006	TYR	137	O
-36.417	20.701	13.845	8.270	1007	SER	138	N
-36.305	24.405	13.532	10.340	1008	SER	138	OG
-35.810	23.101	13.953	8.880	1009	SER	138	CB
-36.934	22.096	13.830	8.560	1010	SER	138	CA
-37.690	22.308	12.529	9.120	1011	SER	138	C
-37.165	22.180	11.411	8.430	1012	SER	138	O
-38.952	22.732	12.664	8.970	1013	SER	139	N
-41.647	23.898	12.407	13.630	1014	SER	139	OG
-41.238	22.781	11.684	10.740	1015	SER	139	CB
-39.753	22.846	11.418	9.080	1016	SER	139	CA
-39.299	24.084	10.653	8.310	1017	SER	139	C
-39.361	24.102	9.400	8.370	1018	SER	139	O
-38.775	25.058	11.347	8.090	1019	SER	140	N
-39.126	27.816	12.485	13.880	1020	SER	140	OG
-38.012	27.417	11.723	9.740	1021	SER	140	CB
-38.317	26.310	10.740	8.680	1022	SER	140	CA
-37.019	26.024	9.966	8.000	1023	SER	140	C
-36.831	26.611	8.909	8.460	1024	SER	140	O
-36.197	25.132	10.531	7.220	1025	VAL	141	N
-33.445	24.975	11.869	6.840	1026	VAL	141	CG2
-32.791	23.574	9.864	8.490	1027	VAL	141	CG1
-33.926	24.102	10.744	7.260	1028	VAL	141	CB
-34.934	24.838	9.826	6.940	1029	VAL	141	CA
-35.268	24.085	8.547	6.170	1030	VAL	141	C
-34.718	24.329	7.466	7.390	1031	VAL	141	O
-36.160	23.117	8.660	6.560	1032	ASN	142	N
-37.833	18.975	8.714	8.480	1033	ASN	142	ND2
-35.839	19.988	9.017	6.410	1034	ASN	142	OD1
-36.960	19.991	8.589	7.190	1035	ASN	142	CG
-37.607	21.221	7.940	7.540	1036	ASN	142	CB
-36.592	22.279	7.519	7.170	1037	ASN	142	CA
-37.155	23.202	6.445	7.620	1038	ASN	142	C
-36.869	23.029	5.251	7.720	1039	ASN	142	O
-37.985	24.158	6.911	7.440	1040	SER	143	N
-40.212	26.836	5.762	13.170	1041	SER	143	OG
-39.747	25.842	6.661	9.660	1042	SER	143	CB
-38.644	25.041	5.920	8.030	1043	SER	143	CA
-37.627	25.915	5.190	7.550	1044	SER	143	C
-37.804	26.150	3.962	8.470	1045	SER	143	O
-36.575	26.367	5.852	5.580	1046	ALA	144	N
-34.482	27.603	6.258	5.650	1047	ALA	144	CB
-35.517	27.142	5.219	5.630	1048	ALA	144	CA
-34.816	26.320	4.133	5.960	1049	ALA	144	C
-34.485	26.833	3.042	6.920	1050	ALA	144	O
-34.547	25.053	4.457	5.300	1051	ALA	145	N
-33.467	22.861	4.136	5.560	1052	ALA	145	CB
-33.923	24.160	3.478	5.610	1053	ALA	145	CA
-34.834	23.922	2.280	5.030	1054	ALA	145	C
-34.337	23.852	1.160	6.050	1055	ALA	145	O
-36.129	23.736	2.474	4.960	1056	ALA	146	N
-38.479	23.245	2.012	5.460	1057	ALA	146	CB
-37.101	23.547	1.406	5.340	1058	ALA	146	CA
-37.141	24.789	0.498	4.820	1059	ALA	146	C
-37.207	24.707	-0.728	6.020	1060	ALA	146	O
-37.148	25.985	1.106	5.260	1061	ARG	147	N
-38.606	29.527	5.301	6.920	1062	ARG	147	NH2
-36.559	30.484	5.732	6.540	1063	ARG	147	NH1
-37.499	30.163	4.843	6.760	1064	ARG	147	CZ
-37.376	30.419	3.540	7.980	1065	ARG	147	NE
-38.414	30.120	2.556	8.240	1066	ARG	147	CD
-38.397	28.742	1.978	7.410	1067	ARG	147	CG
-37.120	28.491	1.227	5.940	1068	ARG	147	CB
-37.091	27.218	0.347	5.650	1069	ARG	147	CA
-35.856	27.309	-0.547	5.580	1070	ARG	147	C
-35.918	27.692	-1.731	6.670	1071	ARG	147	O
-34.687	27.001	0.031	5.350	1072	LEU	148	N
-29.836	26.482	0.648	7.810	1073	LEU	148	CD2
-30.577	28.146	-1.069	6.850	1074	LEU	148	CD1
-30.880	26.802	-0.441	6.950	1075	LEU	148	CG
-32.260	26.701	0.199	6.120	1076	LEU	148	CB
-33.428	27.011	-0.739	5.720	1077	LEU	148	CA
-33.508	28.087	-1.958	5.100	1078	LEU	148	C
-33.248	26.522	-3.088	6.520	1079	LEU	148	O
-33.944	24.867	-1.712	4.730	1080	GLN	149	N

-33.692	20.805	-5.223	8.390	1081	GLN	147	NE2
-32.665	20.674	-3.225	6.910	1082	GLN	149	OE1
-33.625	20.937	-3.910	6.440	1083	GLN	149	CD
-34.902	21.504	-3.296	6.230	1084	GLN	149	CG
-34.594	22.547	-2.227	5.800	1085	GLN	149	CB
-34.138	23.892	-2.812	5.370	1086	GLN	149	CA
-35.111	24.440	-3.858	6.080	1087	GLN	149	C
-34.856	24.433	-5.072	5.900	1088	GLN	149	O
-36.261	24.977	-3.399	6.670	1089	SER	150	N
-38.469	26.904	-2.866	14.760	1090	SER	150	OG
-38.601	25.700	-3.579	10.560	1091	SER	150	CB
-37.293	25.472	-4.348	8.160	1092	SER	150	CA
-36.854	26.679	-5.149	7.780	1093	SER	150	C
-37.330	26.897	-6.296	8.890	1094	SER	150	O
-35.912	27.459	-4.645	7.850	1095	SER	151	N
-33.250	29.022	-4.187	6.720	1096	SER	151	OG
-34.592	29.472	-4.340	7.260	1097	SER	151	CB
-35.355	28.627	-5.346	6.940	1098	SER	151	CA
-34.495	28.231	-6.551	8.030	1099	SER	151	C
-34.105	29.096	-7.372	8.410	1100	SER	151	O
-34.098	26.960	-6.652	8.100	1101	GLY	152	N
-33.384	26.398	-7.752	8.170	1102	GLY	152	CA
-31.947	26.038	-7.441	9.070	1103	GLY	152	C
-31.070	26.134	-8.336	10.500	1104	GLY	152	O
-31.730	25.609	-6.214	9.200	1105	VAL	153	N
-29.898	27.595	-4.826	7.960	1106	VAL	153	CG2
-28.581	25.632	-3.979	7.530	1107	VAL	153	CG1
-29.951	26.091	-4.528	7.860	1108	VAL	153	CB
-30.382	25.208	-5.709	7.660	1109	VAL	153	CA
-30.485	23.742	-5.320	7.520	1110	VAL	153	C
-31.450	23.399	-4.617	8.070	1111	VAL	153	O
-29.503	22.928	-5.722	6.020	1112	MET	154	N
-27.851	16.937	-4.723	11.040	1113	MET	154	CE
-27.684	18.715	-4.589	10.820	1114	MET	154	SD
-28.585	19.304	-6.050	9.300	1115	MET	154	CG
-28.485	20.766	-6.283	6.270	1116	MET	154	CB
-29.409	21.542	-5.314	6.170	1117	MET	154	CA
-28.924	21.521	-3.870	5.420	1118	MET	154	C
-27.762	21.854	-3.627	5.780	1119	MET	154	O
-29.803	21.231	-2.914	4.790	1120	VAL	155	N
-30.880	23.209	-1.068	6.290	1121	VAL	155	CG2
-30.027	21.827	0.864	5.060	1122	VAL	155	CG1
-30.464	21.823	-0.602	5.000	1123	VAL	155	CB
-29.393	21.181	-1.498	4.890	1124	VAL	155	CA
-29.050	19.766	-1.067	5.660	1125	VAL	155	C
-29.883	18.849	-1.168	5.940	1126	VAL	155	O
-27.815	19.614	-0.552	5.160	1127	ALA	156	N
-26.123	17.790	-0.702	6.830	1128	ALA	156	CB
-27.376	18.318	0.011	5.660	1129	ALA	156	CA
-27.089	18.517	1.497	4.780	1130	ALA	156	C
-26.399	19.521	1.833	4.800	1131	ALA	156	O
-27.659	17.677	2.353	2.840	1132	VAL	157	N
-29.314	19.602	3.693	6.290	1133	VAL	157	CG2
-29.812	17.289	4.516	6.890	1134	VAL	157	CG1
-28.758	18.382	4.438	5.520	1135	VAL	157	CB
-27.471	17.864	3.793	4.590	1136	VAL	157	CA
-27.005	16.557	4.458	4.820	1137	VAL	157	C
-27.354	15.454	4.044	4.660	1138	VAL	157	O
-26.295	16.742	5.562	4.690	1139	ALA	158	N
-24.712	15.956	7.223	5.440	1140	ALA	158	CB
-25.825	15.559	6.561	5.210	1141	ALA	158	CA
-26.990	14.881	7.034	4.830	1142	ALA	158	C
-27.842	15.540	7.594	5.990	1143	ALA	158	O
-26.976	13.557	7.073	5.340	1144	ALA	159	N
-27.990	11.301	7.382	4.710	1145	ALA	159	CB
-27.969	12.776	7.812	5.110	1146	ALA	159	CA
-27.779	12.891	9.316	5.600	1147	ALA	159	C
-28.790	12.805	10.034	6.450	1148	ALA	159	O
-26.560	13.118	9.774	4.850	1149	GLY	160	N
-26.219	13.206	11.187	5.480	1150	GLY	160	CA
-25.501	11.993	11.735	6.090	1151	GLY	160	C
-25.619	10.909	11.110	6.500	1152	GLY	160	O
-24.807	12.179	12.862	6.140	1153	ASN	161	N
-20.888	13.130	12.423	14.120	1154	ASN	161	ND2
-22.265	11.987	11.124	11.080	1155	ASN	161	OD1
-21.918	12.315	12.259	10.910	1156	ASN	161	CG
-22.528	11.769	13.538	8.610	1157	ASN	161	CB
-23.902	11.134	13.364	6.920	1158	ASN	161	CA
-24.386	10.485	14.656	8.210	1159	ASN	161	C
-23.550	10.174	15.522	9.980	1160	ASN	161	O
-25.660	10.212	14.814	9.100	1161	ASN	162	N
-27.671	12.551	14.997	15.100	1162	ASN	162	ND2
-26.822	12.652	17.071	16.730	1163	ASN	162	OD1
-27.316	12.000	16.140	14.330	1164	ASN	162	CG
-27.463	10.511	16.378	12.320	1165	ASN	162	CB
-26.213	9.673	16.082	9.580	1166	ASN	162	CA
-26.536	8.177	16.054	9.390	1167	ASN	162	C
-27.114	7.616	17.023	8.960	1168	ASN	162	O
-26.185	7.528	14.982	8.540	1169	ASN	163	N
-25.851	2.881	16.291	10.300	1170	ASN	163	ND2
-26.210	3.380	14.178	10.330	1171	ASN	163	OD1
-25.898	3.742	15.293	8.970	1172	ASN	163	CG
-25.724	5.195	15.605	8.070	1173	ASN	163	CB
-26.586	6.105	14.743	8.370	1174	ASN	163	CA
-28.077	5.978	15.068	9.430	1175	ASN	163	C
-28.449	5.064	15.821	10.620	1176	ASN	163	O
-28.855	6.928	14.526	9.750	1177	ALA	164	N
-30.505	7.874	15.991	10.650	1178	ALA	164	CB
-30.308	6.918	14.821	9.890	1179	ALA	164	CA
-31.115	7.269	13.592	9.630	1180	ALA	164	C
-30.545	7.507	12.523	9.200	1181	ALA	164	O
-32.432	7.256	13.713	8.840	1182	ASP	165	N
-35.649	8.199	10.939	11.280	1183	ASP	165	OD2
-36.113	6.109	11.162	14.290	1184	ASP	165	OD1
-35.564	7.144	11.598	11.830	1185	ASP	165	CG
-34.768	7.080	12.870	10.600	1186	ASP	165	CB
-33.328	7.560	12.620	9.370	1187	ASP	165	CA
-33.231	9.077	12.387	8.330	1188	ASP	165	C
-33.463	9.841	13.340	8.810	1189	ASP	165	O
-32.883	9.439	11.166	8.800	1190	ALA	166	N
-32.108	10.951	9.398	8.870	1191	ALA	166	CB
-32.679	10.857	10.812	9.000	1192	ALA	166	CA
-33.959	11.672	10.865	9.330	1193	ALA	166	C
-33.861	12.905	10.743	9.290	1194	ALA	166	O
-35.111	11.062	11.081	8.610	1195	ARG	167	N
-37.500	10.206	12.775	11.830	1196	ARG	167	CG
-37.541	10.775	11.347	9.790	1197	ARG	167	CB
-36.377	11.793	11.133	8.840	1198	ARG	167	CA
-36.430	12.799	12.264	7.900	1199	ARG	167	C
-37.283	13.692	12.238	8.020	1200	ARG	167	O

-35.577	12.634	13.270	7.620	1201	ASN	169	N
-36.307	10.663	16.424	7.110	1202	ASN	168	ND2
-37.889	12.125	15.775	10.660	1203	ASN	168	OD1
-36.678	11.857	16.071	9.640	1204	ASN	168	CG
-35.427	12.654	15.720	8.560	1205	ASN	168	CB
-35.564	13.504	14.447	6.770	1206	ASN	168	CA
-34.521	14.622	14.393	6.410	1207	ASN	168	C
-34.248	15.280	15.416	7.650	1208	ASN	168	O
-33.981	14.825	13.206	6.090	1209	TYR	169	N
-30.333	12.021	17.468	13.790	1210	TYR	169	OH
-30.513	14.709	15.064	12.030	1211	TYR	169	CD2
-30.223	13.984	16.221	12.350	1212	TYR	169	CE2
-30.664	12.676	16.303	12.650	1213	TYR	169	CZ
-31.364	12.059	15.278	12.070	1214	TYR	169	CE1
-31.622	12.803	14.115	12.160	1215	TYR	169	CD1
-31.180	14.127	14.005	11.200	1216	TYR	169	CG
-31.537	14.956	12.769	9.760	1217	TYR	169	CB
-32.851	15.766	13.016	7.560	1218	TYR	169	CA
-33.142	16.699	11.868	6.390	1219	TYR	169	C
-33.841	16.252	10.955	6.590	1220	TYR	169	O
-32.659	17.916	11.986	5.300	1221	SER	170	N
-35.112	19.487	11.556	7.460	1222	SER	170	OG
-33.807	20.030	11.453	5.970	1223	SER	170	CB
-32.882	18.932	10.937	6.410	1224	SER	170	CA
-31.568	19.547	10.476	6.410	1225	SER	170	C
-30.697	19.742	11.335	7.340	1226	SER	170	O
-31.439	19.923	9.220	6.930	1227	PRO	171	N
-30.403	21.004	7.371	7.420	1228	PRO	171	CG
-30.214	20.698	8.845	7.700	1229	PRO	171	CD
-31.883	20.871	7.119	7.030	1230	PRO	171	CB
-32.375	19.805	8.128	6.280	1231	PRO	171	CA
-32.447	18.418	7.504	5.970	1232	PRO	171	C
-33.139	18.239	6.463	6.920	1233	PRO	171	O
-31.808	17.402	8.103	5.650	1234	ALA	172	N
-31.173	15.085	8.577	5.610	1235	ALA	172	CB
-31.826	16.044	7.554	5.690	1236	ALA	172	CA
-33.225	15.523	7.204	5.590	1237	ALA	172	C
-33.375	14.861	6.190	6.250	1238	ALA	172	O
-34.166	15.852	8.086	5.540	1239	SER	173	N
-36.278	16.590	9.879	6.720	1240	SER	173	OG
-36.182	15.286	9.356	6.870	1241	SER	173	CB
-35.531	15.275	7.991	6.080	1242	SER	173	CA
-36.400	15.953	6.954	7.170	1243	SER	173	C
-37.548	15.547	6.764	8.530	1244	SER	173	O
-35.944	17.027	6.326	7.010	1245	GLU	174	N
-38.871	19.988	4.704	7.290	1246	GLU	174	OE2
-38.816	19.569	2.596	7.690	1247	GLU	174	OE1
-38.271	19.759	3.645	6.540	1248	GLU	174	CD
-36.764	19.773	3.734	6.320	1249	GLU	174	CG
-36.185	19.092	4.982	6.440	1250	GLU	174	CB
-36.743	17.695	5.278	6.140	1251	GLU	174	CA
-36.744	16.841	4.061	6.300	1252	GLU	174	C
-35.727	16.649	3.394	6.160	1253	GLU	174	O
-37.877	16.333	3.626	8.040	1254	PRO	175	N
-39.833	15.106	3.827	9.630	1255	PRO	175	CG
-39.211	16.464	4.268	8.430	1256	PRO	175	CD
-39.398	14.982	2.391	8.960	1257	PRO	175	CB
-37.941	15.431	2.470	7.330	1258	PRO	175	CA
-37.467	15.966	1.139	6.240	1259	PRO	175	C
-36.937	15.172	0.327	5.220	1260	PRO	175	O

-37.674	17.256	0.903	4.860	1261	SER	176	N
-37.548	20.186	0.212	7.060	1262	SER	176	OG
-38.097	19.196	-0.589	6.380	1263	SER	176	CB
-37.380	17.822	-0.413	6.030	1264	SER	176	CA
-35.911	18.012	-0.767	5.360	1265	SER	176	C
-35.642	18.318	-1.960	7.270	1266	SER	176	O
-35.013	17.894	0.190	5.630	1267	VAL	177	N
-32.824	18.295	2.430	6.010	1268	VAL	177	CG2
-33.535	20.342	1.187	7.100	1269	VAL	177	CG1
-32.892	18.945	1.034	5.880	1270	VAL	177	CB
-33.560	18.087	-0.051	4.510	1271	VAL	177	CA
-32.940	16.694	0.207	5.240	1272	VAL	177	C
-33.616	15.660	-0.227	5.540	1273	VAL	177	O
-31.606	16.681	-0.351	4.640	1274	CYS	178	N
-29.585	13.971	-2.593	7.400	1275	CYS	178	SG
-29.985	15.526	-1.776	5.960	1276	CYS	178	CB
-30.900	15.395	-0.576	5.140	1277	CYS	178	CA
-30.152	15.060	0.713	5.140	1278	CYS	178	C
-29.158	15.700	1.018	5.630	1279	CYS	178	O
-30.682	14.038	1.401	4.450	1280	THR	179	N
-30.828	12.846	5.068	5.930	1281	THR	179	CG2
-32.188	14.441	3.784	4.770	1282	THR	179	OG1
-31.319	13.280	3.685	5.230	1283	THR	179	CB
-30.141	13.693	2.718	5.330	1284	THR	179	CA
-29.089	12.568	2.556	5.330	1285	THR	179	C
-29.450	11.535	2.038	5.410	1286	THR	179	O
-27.891	12.801	3.018	4.900	1287	VAL	180	N
-26.173	13.562	0.945	4.930	1288	VAL	180	CG2
-24.413	11.967	1.765	5.920	1289	VAL	180	CG1
-25.656	12.797	2.148	4.720	1290	VAL	180	CB
-26.758	11.904	2.778	4.880	1291	VAL	180	CA
-26.249	11.165	3.992	4.900	1292	VAL	180	C
-25.860	11.765	4.977	5.590	1293	VAL	180	O
-26.225	9.811	3.907	6.000	1294	GLY	181	N
-25.594	9.009	5.011	4.850	1295	GLY	181	CA
-24.118	8.705	4.609	5.370	1296	GLY	181	C
-23.691	8.968	3.463	5.550	1297	GLY	181	O
-23.417	8.094	5.547	4.470	1298	ALA	182	N
-21.171	8.397	6.497	4.900	1299	ALA	182	CB
-21.990	7.817	5.342	4.830	1300	ALA	182	CA
-21.710	6.304	5.271	5.050	1301	ALA	182	C
-22.264	5.503	6.007	4.780	1302	ALA	182	O
-20.740	5.971	4.404	5.350	1303	SER	183	N
-19.922	4.705	1.980	7.670	1304	SER	183	OG
-20.475	3.942	2.979	5.720	1305	SER	183	CB
-20.201	4.602	4.325	5.710	1306	SER	183	CA
-18.681	4.621	4.557	5.890	1307	SER	183	C
-18.039	5.694	4.536	6.570	1308	SER	183	O
-18.112	3.454	4.764	6.340	1309	ASP	184	N
-16.674	0.673	7.593	8.890	1310	ASP	184	OD2
-16.818	0.443	5.377	7.330	1311	ASP	184	OD1
-16.663	1.112	6.411	7.320	1312	ASP	184	CG
-16.379	2.600	6.301	7.290	1313	ASP	184	CB
-16.669	3.264	4.952	6.450	1314	ASP	184	CA
-16.072	2.523	3.737	7.280	1315	ASP	184	C
-16.733	2.150	2.792	6.550	1316	ASP	184	O
-14.772	2.355	3.770	8.750	1317	ARG	185	N
-12.936	4.175	6.230	25.220	1318	ARG	185	NH2
-11.223	3.095	7.200	25.000	1319	ARG	185	NH1
-11.660	3.680	6.110	25.040	1320	ARG	185	CZ

-11.244	3.529	4.859	24.540	1321	ARG	185	NE
-10.335	2.471	3.338	21.720	1322	ARG	185	CD
-11.100	1.844	3.158	19.700	1323	ARG	185	CG
-12.505	1.585	3.537	15.250	1324	ARG	185	CB
-13.840	1.805	2.786	11.490	1325	ARG	185	CA
-14.276	0.435	2.289	10.860	1326	ARG	185	C
-13.957	0.012	1.171	10.390	1327	ARG	185	O
-14.933	-0.283	3.190	10.840	1328	TYR	186	N
-9.453	-2.061	5.378	20.590	1329	TYR	186	OH
-12.543	-3.133	3.701	16.600	1330	TYR	186	CD2
-11.174	-2.978	3.962	17.880	1331	TYR	186	CE2
-10.791	-2.229	5.074	18.450	1332	TYR	186	CZ
-11.731	-1.609	5.888	17.320	1333	TYR	186	CE1
-13.083	-1.749	5.586	15.670	1334	TYR	186	CD1
-13.507	-2.534	4.519	14.840	1335	TYR	186	CG
-14.988	-2.599	4.205	12.450	1336	TYR	186	CB
-15.329	-1.677	2.993	10.880	1337	TYR	186	CA
-16.808	-1.806	2.656	9.780	1338	TYR	186	C
-17.356	-2.913	2.743	9.650	1339	TYR	186	O
-17.453	-0.716	2.266	8.430	1340	ASP	187	N
-18.361	0.344	-0.564	9.090	1341	ASP	187	OD2
-18.764	-1.504	-1.699	11.430	1342	ASP	187	OD1
-18.685	-0.877	-0.620	10.630	1343	ASP	187	CG
-19.071	-1.581	0.648	8.360	1344	ASP	187	CB
-18.859	-0.701	1.883	8.530	1345	ASP	187	CA
-19.802	-1.039	3.043	8.150	1346	ASP	187	C
-20.857	-1.686	2.809	9.450	1347	ASP	187	O
-19.435	-0.647	4.236	6.960	1348	ARG	188	N
-14.911	-1.735	8.513	11.780	1349	ARG	188	NH2
-15.584	-3.879	8.553	11.290	1350	ARG	188	NH1
-15.857	-2.620	8.269	10.790	1351	ARG	188	CZ
-17.057	-2.213	7.850	10.930	1352	ARG	188	NE
-18.199	-3.082	7.684	9.240	1353	ARG	188	CD
-18.969	-2.689	6.475	8.810	1354	ARG	188	CG
-19.580	-1.292	6.649	8.110	1355	ARG	188	CB
-20.291	-0.805	5.398	7.650	1356	ARG	188	CA
-20.889	0.586	5.702	7.280	1357	ARG	188	C
-20.192	1.557	5.444	7.890	1358	ARG	188	O
-22.130	0.649	6.097	6.700	1359	ARG	189	N
-26.304	0.966	11.502	13.630	1360	ARG	189	NH2
-25.902	3.185	11.312	11.790	1361	ARG	189	NH1
-26.094	2.020	10.709	11.830	1362	ARG	189	CZ
-26.144	1.822	9.388	11.020	1363	ARG	189	NE
-25.961	2.847	8.396	9.950	1364	ARG	189	CD
-24.565	3.023	7.931	8.510	1365	ARG	189	CG
-24.033	1.718	7.303	8.250	1366	ARG	189	CB
-22.644	1.895	6.690	7.960	1367	ARG	189	CA
-21.631	2.294	7.789	7.450	1368	ARG	189	C
-21.264	1.470	8.664	7.320	1369	ARG	189	O
-21.270	3.576	7.776	7.270	1370	SER	190	N
-19.373	5.690	7.381	8.130	1371	SER	190	OG
-19.968	5.496	8.652	7.740	1372	SER	190	CB
-20.373	4.054	8.859	7.740	1373	SER	190	CA
-21.089	3.819	10.188	7.140	1374	SER	190	C
-22.297	4.013	10.299	7.980	1375	SER	190	O
-20.329	3.447	11.230	8.830	1376	SER	191	N
-19.034	3.482	13.753	12.850	1377	SER	191	OG
-20.005	2.514	13.527	11.040	1378	SER	191	CB
-20.969	3.083	12.494	9.290	1379	SER	191	CA
-21.758	4.209	13.153	9.390	1380	SER	191	C
-22.684	3.856	13.896	10.790	1381	SER	191	O
-21.429	5.462	12.893	7.910	1382	PHE	192	N
-18.977	7.467	12.346	7.050	1383	PHE	192	CD2
-18.215	7.645	11.214	5.820	1384	PHE	192	CE2
-18.753	8.347	10.146	7.180	1385	PHE	192	CZ
-20.073	8.892	10.229	7.550	1386	PHE	192	CE1
-20.814	8.696	11.375	7.360	1387	PHE	192	CD1
-20.285	7.964	12.449	6.940	1388	PHE	192	CG
-21.095	7.747	13.701	6.940	1389	PHE	192	CB
-22.110	6.618	13.476	7.290	1390	PHE	192	CA
-23.240	7.140	12.573	6.240	1391	PHE	192	C
-24.021	7.988	13.055	7.090	1392	PHE	192	O
-23.350	6.651	11.372	6.440	1393	SER	193	N
-24.959	7.403	8.099	7.300	1394	SER	193	OG
-24.117	6.673	9.011	6.860	1395	SER	193	CB
-24.297	7.228	10.401	6.580	1396	SER	193	CA
-25.762	7.039	10.827	6.360	1397	SER	193	C
-26.185	5.924	11.152	8.060	1398	SER	193	O
-26.517	8.137	10.760	5.470	1399	ASN	194	N
-28.099	9.365	13.339	5.470	1400	ASN	194	ND2
-28.894	11.313	12.491	9.000	1401	ASN	194	OD1
-28.562	10.086	12.320	7.120	1402	ASN	194	CG
-28.631	9.470	10.940	5.460	1403	ASN	194	CB
-27.986	8.077	10.877	5.600	1404	ASN	194	CA
-28.497	7.269	9.676	6.040	1405	ASN	194	C
-27.770	7.099	8.692	6.060	1406	ASN	194	O
-29.722	6.798	9.776	6.170	1407	TYR	195	N
-31.402	3.161	14.332	14.810	1408	TYR	195	OH
-31.723	3.833	10.766	9.850	1409	TYR	195	CD2
-32.045	3.559	12.086	11.850	1410	TYR	195	CE2
-31.040	3.504	13.045	13.060	1411	TYR	195	CZ
-29.736	3.795	12.693	12.510	1412	TYR	195	CE1
-29.445	4.122	11.366	11.330	1413	TYR	195	CD1
-30.440	4.140	10.391	9.020	1414	TYR	195	CG
-30.116	4.509	8.962	7.980	1415	TYR	195	CB
-30.386	6.016	8.716	6.960	1416	TYR	195	CA
-31.862	6.369	8.704	7.440	1417	TYR	195	C
-32.232	7.346	9.367	6.940	1418	TYR	195	O
-32.664	5.553	8.039	8.240	1419	GLY	196	N
-34.129	5.857	8.042	8.020	1420	GLY	196	CA
-34.581	6.161	6.618	9.230	1421	GLY	196	C
-33.835	6.287	5.643	8.720	1422	GLY	196	O
-35.918	6.227	6.540	8.870	1423	SER	197	N
-38.596	7.191	6.320	14.540	1424	SER	197	OG
-38.097	6.208	5.407	11.120	1425	SER	197	CB
-36.592	6.399	5.245	9.810	1426	SER	197	CA
-36.292	7.757	4.603	8.050	1427	SER	197	C
-36.447	7.805	3.392	8.340	1428	SER	197	O
-35.861	8.732	5.384	7.900	1429	VAL	198	N
-36.066	12.477	5.079	11.340	1430	VAL	198	CG2
-34.773	11.262	6.870	10.480	1431	VAL	198	CG1
-35.853	11.138	5.809	9.720	1432	VAL	198	CB
-35.618	10.057	4.770	8.400	1433	VAL	198	CA
-34.294	10.111	4.030	8.600	1434	VAL	198	C
-34.083	11.078	3.230	9.270	1435	VAL	198	O
-33.385	9.160	4.274	7.750	1436	LEU	199	N
-29.047	7.645	5.324	8.600	1437	LEU	199	CD2
-31.019	8.848	6.385	7.900	1438	LEU	199	CD1
-30.204	8.612	5.148	7.900	1439	LEU	199	CG
-31.138	8.145	4.029	7.210	1440	LEU	199	CB

-32.102	9.229	3.536	5.880	1441	LEU	199	CA
-32.379	9.053	2.077	6.370	1442	LEU	199	C
-33.177	8.161	1.715	7.220	1443	LEU	199	O
-31.654	9.758	1.218	5.360	1444	ASP	200	N
-33.972	11.484	-1.113	8.310	1445	ASP	200	OD2
-32.828	12.662	0.333	6.670	1446	ASP	200	OD1
-32.910	11.821	-0.537	7.550	1447	ASP	200	CG
-31.684	11.002	-0.951	6.170	1448	ASP	200	CB
-31.736	9.631	-0.211	5.650	1449	ASP	200	CA
-30.582	8.793	-0.803	4.990	1450	ASP	200	C
-30.763	8.220	-1.870	5.820	1451	ASP	200	O
-29.455	8.824	-0.141	4.500	1452	ILE	201	N
-27.125	7.731	-3.830	7.430	1453	ILE	201	CD1
-26.657	8.787	-2.790	6.920	1454	ILE	201	CG1
-27.800	9.296	-1.899	5.100	1455	ILE	201	CB
-27.465	10.734	-1.339	6.220	1456	ILE	201	CG2
-28.197	8.304	-0.751	4.640	1457	ILE	201	CA
-27.121	8.227	0.319	4.820	1458	ILE	201	C
-27.206	8.916	1.331	5.340	1459	ILE	201	O
-26.137	7.378	0.011	5.090	1460	PHE	202	N
-25.014	5.462	3.760	6.810	1461	PHE	202	CD2
-25.777	5.083	4.871	7.530	1462	PHE	202	CE2
-27.078	4.571	4.646	8.700	1463	PHE	202	CZ
-27.600	4.520	3.345	8.100	1464	PHE	202	CE1
-26.847	4.953	2.269	7.320	1465	PHE	202	CD1
-25.517	5.391	2.470	6.230	1466	PHE	202	CG
-24.728	5.826	1.289	6.600	1467	PHE	202	CB
-24.934	7.284	0.840	4.900	1468	PHE	202	CA
-23.723	7.780	0.057	5.480	1469	PHE	202	C
-23.660	7.665	-1.181	6.710	1470	PHE	202	O
-22.765	8.377	0.762	4.690	1471	GLY	203	N
-21.448	8.623	0.143	5.480	1472	GLY	203	CA
-20.389	8.276	1.188	5.150	1473	GLY	203	C
-20.644	8.010	2.364	5.730	1474	GLY	203	O
-19.125	8.289	0.744	5.220	1475	PRO	204	N
-17.320	7.840	-0.680	6.360	1476	PRO	204	CG
-18.714	8.420	-0.676	6.500	1477	PRO	204	CD
-16.771	8.154	0.680	5.570	1478	PRO	204	CB
-17.999	7.967	1.606	5.140	1479	PRO	204	CA
-17.868	8.913	2.778	4.650	1480	PRO	204	C
-17.876	10.142	2.478	5.520	1481	PRO	204	O
-17.812	8.442	3.991	5.190	1482	GLY	205	N
-17.736	9.358	5.157	5.160	1483	GLY	205	CA
-16.783	8.924	6.245	5.910	1484	GLY	205	C
-16.670	9.709	7.218	7.220	1485	GLY	205	O
-16.160	7.766	6.152	5.550	1486	THR	206	N
-14.394	5.357	8.690	7.160	1487	THR	206	CG2
-16.753	5.817	8.291	7.380	1488	THR	206	OG1
-15.422	5.871	7.681	6.780	1489	THR	206	CB
-15.178	7.343	7.188	6.390	1490	THR	206	CA
-13.739	7.500	6.663	6.530	1491	THR	206	C
-13.426	6.967	5.598	6.490	1492	THR	206	O
-12.974	8.252	7.433	6.760	1493	SER	207	N
-11.013	6.313	6.364	17.620	1494	SER	207	OG
-10.799	7.185	7.407	10.340	1495	SER	207	CB
-11.556	8.481	7.192	8.360	1496	SER	207	CA
-11.286	9.093	5.818	7.310	1497	SER	207	C
-10.695	8.527	4.898	7.920	1498	SER	207	O
-11.820	10.314	5.715	6.110	1499	ILE	208	N
-14.068	9.682	3.047	5.690	1500	ILE	208	CD1
-14.302	10.734	4.191	4.960	1501	ILE	208	CG1
-13.171	11.784	4.935	4.230	1502	ILE	208	CG2
-13.070	12.676	2.977	6.160	1503	ILE	208	CG2
-11.762	11.091	4.484	5.760	1504	ILE	208	CA
-10.659	12.150	4.562	6.150	1505	ILE	208	C
-10.728	13.003	5.456	5.160	1506	ILE	208	O
-9.688	12.045	3.666	6.210	1507	LEU	209	N
-5.103	12.485	1.936	10.300	1508	LEU	209	CD2
-5.595	13.513	4.147	10.160	1509	LEU	209	CD1
-6.158	13.212	2.768	9.130	1510	LEU	209	CG
-7.411	12.354	2.832	7.470	1511	LEU	209	CB
-8.619	13.017	3.546	5.870	1512	LEU	209	CA
-9.066	14.246	2.745	5.530	1513	LEU	209	C
-9.632	14.088	1.664	5.240	1514	LEU	209	O
-8.818	15.397	3.334	5.190	1515	SER	210	N
-10.974	18.019	1.847	6.610	1516	SER	210	OG
-10.628	16.919	2.672	5.400	1517	SER	210	CB
-9.115	16.670	2.623	5.600	1518	SER	210	CA
-8.290	17.795	3.204	5.710	1519	SER	210	C
-7.421	17.631	4.072	6.460	1520	SER	210	O
-8.497	18.986	2.660	5.290	1521	THR	211	N
-7.460	21.281	0.791	4.930	1522	THR	211	CG2
-9.572	21.303	1.964	6.180	1523	THR	211	OG1
-8.119	21.370	2.152	5.660	1524	THR	211	CB
-7.801	20.180	3.138	5.380	1525	THR	211	CA
-8.155	20.509	4.572	6.580	1526	THR	211	C
-9.240	20.244	5.076	6.990	1527	THR	211	O
-7.191	21.192	5.246	6.310	1528	TRP	212	N
-8.662	20.557	9.531	6.810	1529	TRP	212	CD2
-9.703	19.829	8.948	6.600	1530	TRP	212	CE3
-10.805	19.538	9.735	6.210	1531	TRP	212	CZ3
-10.854	19.910	11.058	6.890	1532	TRP	212	CH2
-9.818	20.603	11.703	6.690	1533	TRP	212	CZ2
-8.736	20.934	10.901	7.310	1534	TRP	212	CE2
-7.558	21.563	11.217	6.840	1535	TRP	212	NE1
-6.779	21.608	10.091	7.100	1536	TRP	212	CD1
-7.385	20.990	9.030	6.270	1537	TRP	212	CG
-6.860	20.771	7.662	6.080	1538	TRP	212	CB
-7.404	21.700	6.605	6.430	1539	TRP	212	CA
-6.826	23.129	6.688	7.120	1540	TRP	212	C
-6.145	23.499	5.743	7.950	1541	TRP	212	O
-7.135	23.825	7.776	7.340	1542	ILE	213	N
-6.607	25.210	7.946	8.670	1543	ILE	213	CA
-7.417	25.983	9.022	8.680	1544	ILE	213	CB
-8.878	26.281	8.575	8.510	1545	ILE	213	CG2
-7.412	25.228	10.382	9.770	1546	ILE	213	CG1
-7.841	26.127	11.583	10.100	1547	ILE	213	CD1
-5.073	25.156	8.197	9.310	1548	ILE	213	C
-4.468	24.149	8.543	9.500	1549	ILE	213	O
-4.456	26.297	7.875	10.190	1550	GLY	214	N
-2.982	26.419	8.013	10.340	1551	GLY	214	CA
-2.353	25.834	6.790	9.700	1552	GLY	214	C
-1.151	25.406	6.830	11.820	1553	GLY	214	O
-3.083	25.706	5.698	8.740	1554	GLY	215	N
-2.567	25.109	4.467	8.520	1555	GLY	215	CA
-2.145	23.649	4.619	8.670	1556	GLY	215	C
-1.270	23.131	3.972	10.180	1557	GLY	215	O
-2.886	22.922	5.482	8.300	1558	SER	216	N
-3.509	21.613	8.007	11.620	1559	SER	216	OG
-2.288	21.306	7.292	8.710	1560	SER	216	CB

-2.545	21.512	5.790	7.630	1561	SER	216	CA
-3.645	20.597	5.245	7.750	1562	SER	216	C
-4.422	20.959	4.353	6.780	1563	SER	216	O
-3.597	19.369	5.700	6.620	1564	THR	217	N
-3.786	18.190	2.755	8.680	1565	THR	217	CG2
-2.887	16.803	4.518	10.310	1566	THR	217	OG1
-4.105	17.459	4.063	7.530	1567	THR	217	CB
-4.536	18.306	5.293	7.530	1568	THR	217	CA
-4.760	17.456	6.533	8.480	1569	THR	217	C
-3.956	17.467	7.468	7.910	1570	THR	217	O
-5.878	16.748	6.544	8.370	1571	ARG	218	N
-7.145	18.496	13.437	8.740	1572	ARG	218	NH2
-5.205	19.497	12.744	9.340	1573	ARG	218	NH1
-6.303	18.763	12.499	8.060	1574	ARG	218	CZ
-6.486	18.305	11.247	8.920	1575	ARG	218	NE
-7.690	17.487	11.013	9.450	1576	ARG	218	CD
-7.550	16.473	9.975	10.440	1577	ARG	218	CG
-6.970	16.907	8.708	9.220	1578	ARG	218	CB
-6.301	15.956	7.729	8.280	1579	ARG	218	CA
-7.366	14.949	7.264	8.070	1580	ARG	218	C
-8.105	15.268	6.324	6.870	1581	ARG	218	O
-7.387	13.825	7.936	7.880	1582	SER	219	N
-7.077	11.323	6.314	14.200	1583	SER	219	OG
-7.831	11.421	7.509	10.300	1584	SER	219	CB
-8.426	12.801	7.678	8.700	1585	SER	219	CA
-9.403	12.818	8.848	8.350	1586	SER	219	C
-8.964	12.720	9.986	10.430	1587	SER	219	O
-10.682	12.969	8.613	8.290	1588	ILE	220	N
-13.421	16.534	9.480	7.960	1589	ILE	220	CD1
-12.560	15.311	8.993	7.750	1590	ILE	220	CG1
-12.067	14.413	10.133	7.890	1591	ILE	220	CB
-10.882	15.119	10.860	9.220	1592	ILE	220	CG2
-11.719	12.973	9.646	7.190	1593	ILE	220	CA
-12.923	12.181	9.124	6.400	1594	ILE	220	C
-12.976	11.875	7.914	6.400	1595	ILE	220	O
-13.853	11.892	10.004	6.560	1596	SER	221	N
-13.728	9.025	10.106	7.130	1597	SER	221	OG
-14.862	9.728	10.496	6.950	1598	SER	221	CB
-15.005	11.031	9.680	7.230	1599	SER	221	CA
-16.335	11.678	10.047	6.570	1600	SER	221	C
-16.380	12.381	11.073	8.530	1601	SER	221	O
-17.362	11.395	9.258	5.900	1602	GLY	222	N
-18.715	11.884	9.590	5.750	1603	GLY	222	CA
-19.557	11.932	8.339	4.880	1604	GLY	222	C
-19.149	11.829	7.184	5.170	1605	GLY	222	O
-20.876	12.076	8.637	5.840	1606	THR	223	N
-23.624	10.708	8.386	5.510	1607	THR	223	CG2
-23.648	13.043	9.033	5.260	1608	THR	223	OG1
-23.338	12.147	7.954	4.720	1609	THR	223	CB
-21.822	12.350	7.552	5.390	1610	THR	223	CA
-21.502	13.754	6.973	4.740	1611	THR	223	C
-21.912	14.000	5.841	5.610	1612	THR	223	O
-20.818	14.565	7.765	4.430	1613	SER	224	N
-20.382	17.291	9.162	10.390	1614	SER	224	OG
-19.480	16.552	8.336	6.320	1615	SER	224	CB
-20.285	15.843	7.251	4.870	1616	SER	224	CA
-19.360	15.659	6.056	4.680	1617	SER	224	C
-19.212	16.574	5.220	5.220	1618	SER	224	O
-18.616	14.583	5.978	4.300	1619	MET	225	N
-16.171	16.403	7.535	8.480	1620	MET	225	CE
-16.154	14.449	7.004	7.900	1621	MET	225	SD
-15.516	13.977	6.325	6.210	1622	MET	225	CG
-16.563	13.361	5.460	4.930	1623	MET	225	CB
-17.650	14.256	4.906	4.330	1624	MET	225	CA
-18.346	13.638	3.691	3.800	1625	MET	225	C
-17.948	13.723	2.503	5.350	1626	MET	225	O
-19.439	12.913	3.948	4.660	1627	ALA	226	N
-21.166	11.214	3.478	3.790	1628	ALA	226	CB
-20.196	12.223	2.883	3.920	1629	ALA	226	CA
-20.935	13.223	2.005	2.810	1630	ALA	226	C
-20.993	13.138	0.788	4.340	1631	ALA	226	O
-21.519	14.230	2.701	3.650	1632	THR	227	N
-23.727	17.339	2.480	4.790	1633	THR	227	CG2
-23.655	15.490	4.098	4.430	1634	THR	227	OG1
-22.860	16.300	3.155	3.910	1635	THR	227	CB
-22.332	15.295	2.088	3.930	1636	THR	227	CA
-21.651	16.036	0.918	4.130	1637	THR	227	C
-22.266	16.059	-0.153	4.530	1638	THR	227	O
-20.401	16.463	1.102	4.140	1639	PRO	228	N
-18.322	17.087	2.014	4.690	1640	PRO	228	CG
-19.715	16.627	2.396	5.340	1641	PRO	228	CD
-18.458	17.801	0.689	4.690	1642	PRO	228	CB
-19.676	17.176	0.030	4.500	1643	PRO	228	CA
-19.337	16.306	-1.151	3.530	1644	PRO	228	C
-19.176	16.822	-2.278	4.780	1645	PRO	228	O
-19.254	15.003	-0.951	4.780	1646	HIS	229	N
-17.191	12.418	0.190	3.610	1647	HIS	229	CD2
-15.893	11.934	0.256	7.560	1648	HIS	229	NE2
-15.478	11.537	-0.909	5.450	1649	HIS	229	CE1
-16.471	11.718	-1.766	7.020	1650	HIS	229	ND1
-17.526	12.276	-1.118	5.490	1651	HIS	229	CG
-18.876	12.595	-1.690	4.920	1652	HIS	229	CB
-19.022	14.085	-2.077	5.030	1653	HIS	229	CA
-20.221	14.175	-3.038	5.400	1654	HIS	229	C
-20.045	14.214	-4.237	5.590	1655	HIS	229	O
-21.415	14.184	-2.366	5.350	1656	VAL	230	N
-23.916	14.406	-1.018	10.570	1657	VAL	230	CG2
-23.725	12.142	-2.023	7.350	1658	VAL	230	CG1
-23.802	13.648	-2.306	6.360	1659	VAL	230	CB
-22.666	14.221	-3.178	5.690	1660	VAL	230	CA
-22.866	15.596	-3.766	4.770	1661	VAL	230	C
-23.290	15.741	-4.945	5.870	1662	VAL	230	O
-22.568	16.654	-3.012	4.770	1663	ALA	231	N
-22.295	18.992	-2.391	4.720	1664	ALA	231	CB
-22.656	18.044	-3.516	5.070	1665	ALA	231	CA
-21.721	18.256	-4.707	4.490	1666	ALA	231	C
-22.150	18.763	-5.755	4.920	1667	ALA	231	O
-20.498	17.740	-4.584	4.260	1668	GLY	232	N
-19.518	17.772	-5.685	4.860	1669	GLY	232	CA
-20.004	16.930	-6.862	5.700	1670	GLY	232	C
-19.857	17.396	-8.029	7.420	1671	GLY	232	O
-20.595	15.773	-6.632	5.080	1672	LEU	233	N
-22.507	11.322	-7.620	7.020	1673	LEU	233	CD2
-20.943	12.309	-9.271	7.780	1674	LEU	233	CD1
-22.038	12.616	-8.275	7.100	1675	LEU	233	CG
-21.537	13.567	-7.191	5.710	1676	LEU	233	CB
-21.098	14.925	-7.727	4.990	1677	LEU	233	CA
-22.207	15.630	-8.531	4.750	1678	LEU	233	C
-22.261	15.574	-9.757	5.170	1679	LEU	233	O
-23.102	16.256	-7.794	5.070	1680	ALA	234	N

-25.165	17.547	-7.749	5.330	1681	ALA	234	CB
-24.218	17.926	-8.425	5.600	1682	ALA	234	CA
-23.623	18.123	-9.294	5.620	1683	ALA	234	C
-24.072	18.262	-10.464	5.820	1684	ALA	234	O
-22.663	18.883	-8.766	5.700	1685	ALA	235	N
-20.949	20.723	-8.772	6.250	1686	ALA	235	CB
-22.027	19.969	-9.552	6.560	1687	ALA	235	CA
-21.446	19.393	-10.849	6.210	1688	ALA	235	C
-21.630	19.953	-11.957	7.510	1689	ALA	235	O
-20.787	18.259	-10.696	5.320	1690	TYR	236	N
-17.443	12.533	-14.972	8.350	1691	TYR	236	OH
-19.552	14.212	-12.549	7.040	1692	TYR	236	CD2
-19.111	13.282	-13.469	6.710	1693	TYR	236	CE2
-17.899	13.509	-14.127	8.290	1694	TYR	236	CZ
-17.187	14.671	-13.847	7.520	1695	TYR	236	CE1
-17.611	15.573	-12.870	7.490	1696	TYR	236	CD1
-18.858	15.366	-12.231	7.070	1697	TYR	236	CG
-19.373	16.348	-11.223	6.940	1698	TYR	236	CB
-20.133	17.557	-11.809	6.500	1699	TYR	236	CA
-21.157	17.143	-12.892	6.790	1700	TYR	236	C
-20.952	17.368	-14.097	6.970	1701	TYR	236	O
-22.260	16.581	-12.430	5.870	1702	LEU	237	N
-23.578	12.833	-13.112	13.340	1703	LEU	237	CD2
-24.700	13.166	-11.022	9.880	1704	LEU	237	CD1
-23.730	13.821	-11.965	9.330	1705	LEU	237	CG
-24.214	15.140	-12.563	7.900	1706	LEU	237	CB
-23.340	16.124	-13.327	6.960	1707	LEU	237	CA
-24.099	17.273	-13.976	6.580	1708	LEU	237	C
-24.508	17.119	-15.154	7.170	1709	LEU	237	O
-24.322	18.356	-13.259	6.410	1710	MET	238	N
-27.022	22.510	-10.804	15.560	1711	MET	238	CE
-26.622	20.870	-10.300	16.580	1712	MET	238	SD
-26.529	20.073	-11.969	13.020	1713	MET	238	CG
-25.303	20.581	-12.741	10.850	1714	MET	238	CB
-24.988	19.529	-13.847	8.700	1715	MET	238	CA
-24.149	20.143	-14.963	8.710	1716	MET	238	C
-24.715	20.465	-16.038	9.400	1717	MET	238	O
-22.809	20.256	-14.779	8.620	1718	THR	239	N
-20.456	21.661	-14.033	10.410	1719	THR	239	CG2
-19.545	20.851	-16.246	14.730	1720	THR	239	OG1
-20.638	21.465	-15.481	12.220	1721	THR	239	CB
-22.015	20.808	-15.891	10.200	1722	THR	239	CA
-21.946	19.855	-17.091	10.290	1723	THR	239	C
-21.805	20.351	-18.229	11.340	1724	THR	239	O
-22.109	18.565	-16.904	10.440	1725	LEU	240	N
-20.234	14.863	-16.397	15.930	1726	LEU	240	CD2
-19.671	16.064	-18.565	15.080	1727	LEU	240	CD1
-20.743	15.387	-17.742	15.260	1728	LEU	240	CG
-21.958	16.215	-17.461	13.000	1729	LEU	240	CB
-22.214	17.593	-18.000	11.200	1730	LEU	240	CA
-23.609	17.681	-18.644	10.990	1731	LEU	240	C
-23.763	17.063	-19.695	12.310	1732	LEU	240	O
-24.539	18.369	-18.024	9.520	1733	GLY	241	N
-25.895	18.479	-18.628	10.850	1734	GLY	241	CA
-26.753	17.220	-18.419	9.630	1735	GLY	241	C
-27.789	17.027	-19.117	11.410	1736	GLY	241	O
-26.399	16.360	-17.497	9.970	1737	LYS	242	N
-24.790	11.155	-20.148	22.450	1738	LYS	242	NZ
-24.191	11.974	-19.011	20.050	1739	LYS	242	CE
-25.329	12.764	-18.421	17.780	1740	LYS	242	CD
-24.993	13.573	-17.193	15.500	1741	LYS	242	CG
-26.265	14.065	-16.502	12.140	1742	LYS	242	CB
-27.080	15.116	-17.247	10.640	1743	LYS	242	CA
-28.371	15.378	-16.450	10.460	1744	LYS	242	C
-29.315	14.565	-16.531	10.050	1745	LYS	242	O
-28.347	16.443	-15.665	10.100	1746	THR	243	N
-28.099	16.307	-12.549	9.850	1747	THR	243	CG2
-30.519	15.756	-12.658	9.990	1748	THR	243	OG1
-29.258	15.790	-13.415	10.790	1749	THR	243	CB
-29.447	16.673	-14.693	10.170	1750	THR	243	CA
-29.493	18.156	-14.339	10.690	1751	THR	243	C
-28.688	18.919	-14.884	11.560	1752	THR	243	O
-30.460	18.535	-13.528	10.150	1753	THR	244	N
-32.260	20.433	-15.110	12.170	1754	THR	244	CG2
-33.041	19.767	-12.897	12.300	1755	THR	244	OG1
-32.036	20.538	-13.614	11.010	1756	THR	244	CB
-30.669	19.934	-13.101	10.520	1757	THR	244	CA
-30.711	19.972	-11.575	9.360	1758	THR	244	C
-30.741	18.894	-10.947	8.220	1759	THR	244	O
-30.734	21.204	-11.058	8.340	1760	ALA	245	N
-30.682	22.796	-9.167	8.710	1761	ALA	245	CB
-30.790	21.340	-9.580	8.260	1762	ALA	245	CA
-32.008	20.664	-8.994	8.770	1763	ALA	245	C
-31.897	20.034	-7.930	9.360	1764	ALA	245	O
-33.179	20.809	-9.645	9.210	1765	ALA	246	N
-35.638	20.699	-9.970	10.740	1766	ALA	246	CB
-34.414	20.217	-9.172	10.140	1767	ALA	246	CA
-34.416	18.698	-9.171	9.930	1768	ALA	246	C
-35.103	18.160	-8.293	10.800	1769	ALA	246	O
-33.712	18.044	-10.091	8.600	1770	SER	247	N
-33.432	16.751	-12.473	14.430	1771	SER	247	OG
-34.358	16.214	-11.568	10.820	1772	SER	247	CB
-33.808	16.589	-10.186	10.130	1773	SER	247	CA
-32.474	15.874	-9.923	8.990	1774	SER	247	C
-32.479	14.621	-9.984	8.970	1775	SER	247	O
-31.465	16.608	-9.446	8.430	1776	ALA	248	N
-29.045	17.048	-9.030	8.740	1777	ALA	248	CB
-30.123	15.974	-9.272	7.620	1778	ALA	248	CA
-30.141	14.860	-8.238	7.100	1779	ALA	248	C
-29.541	13.793	-8.475	6.230	1780	ALA	248	O
-30.866	15.060	-7.132	6.700	1781	CYS	249	N
-31.421	13.439	-3.393	8.160	1782	CYS	249	SG
-31.579	14.604	-4.800	7.530	1783	CYS	249	CB
-30.875	14.060	-6.056	6.740	1784	CYS	249	CA
-31.511	12.756	-6.571	7.180	1785	CYS	249	C
-30.975	11.646	-6.313	8.370	1786	CYS	249	O
-32.626	12.892	-7.280	7.820	1787	ARG	250	N
-33.724	12.103	-13.683	24.530	1788	ARG	250	NH2
-33.837	13.280	-11.784	25.820	1789	ARG	250	NH1
-34.268	12.208	-12.448	24.210	1790	ARG	250	CZ
-35.228	11.374	-11.992	22.800	1791	ARG	250	NE
-35.926	11.604	-10.702	19.690	1792	ARG	250	CD
-35.213	11.084	-9.501	16.400	1793	ARG	250	CG
-34.619	12.147	-8.579	12.480	1794	ARG	250	CB
-33.289	11.732	-7.913	9.820	1795	ARG	250	CA
-32.381	11.073	-8.941	8.360	1796	ARG	250	C
-32.320	9.874	-8.939	8.580	1797	ARG	250	O
-31.725	11.811	-9.796	7.460	1798	TYR	251	N
-26.830	10.443	-15.758	10.770	1799	TYR	251	OH
-29.862	11.391	-13.945	9.390	1800	TYR	251	CD2

-29.010	10.995	-14.944	10.270	1801	TYR	251	CE2
-27.440	10.030	-14.750	10.330	1802	TYR	251	CZ
-27.117	11.475	-13.609	9.850	1803	TYR	251	CE1
-27.970	11.978	-12.637	8.880	1804	TYR	251	CD1
-29.373	11.962	-12.788	8.200	1805	TYR	251	CG
-30.265	12.468	-11.671	7.600	1806	TYR	251	CB
-30.796	11.302	-10.794	7.280	1807	TYR	251	CA
-29.646	10.531	-10.136	7.640	1808	TYR	251	C
-29.288	9.415	-10.572	7.850	1809	TYR	251	O
-29.082	11.094	-9.059	7.180	1810	ILE	252	N
-26.042	13.939	-7.163	13.330	1811	ILE	252	CD1
-26.975	12.771	-7.945	10.110	1812	ILE	252	CG1
-27.183	11.255	-7.637	9.710	1813	ILE	252	CB
-26.646	10.584	-6.318	8.370	1814	ILE	252	CG2
-27.972	10.388	-8.439	7.640	1815	ILE	252	CA
-28.487	9.099	-7.778	7.750	1816	ILE	252	C
-27.803	8.054	-7.886	8.610	1817	ILE	252	O
-29.691	9.090	-7.247	6.870	1818	ALA	253	N
-31.545	8.102	-5.877	8.090	1819	ALA	253	CB
-30.271	7.847	-6.683	8.070	1820	ALA	253	CA
-30.551	6.827	-7.793	8.350	1821	ALA	253	C
-30.310	5.608	-7.588	9.070	1822	ALA	253	O
-31.025	7.270	-8.941	8.240	1823	ASP	254	N
-34.229	7.132	-10.189	14.840	1824	ASP	254	OD2
-33.917	8.401	-11.910	15.900	1825	ASP	254	OD1
-33.520	7.589	-11.069	13.090	1826	ASP	254	CG
-32.077	7.130	-11.196	11.910	1827	ASP	254	CB
-31.391	6.418	-10.060	9.600	1828	ASP	254	CA
-30.131	5.759	-10.655	9.870	1829	ASP	254	C
-30.228	4.656	-11.215	11.020	1830	ASP	254	O
-29.028	6.472	-10.577	8.740	1831	THR	255	N
-28.069	7.573	-13.304	8.920	1832	THR	255	CG2
-26.878	8.257	-11.289	8.800	1833	THR	255	OG1
-27.163	7.119	-12.153	8.800	1834	THR	255	CB
-27.789	5.992	-11.227	9.180	1835	THR	255	CA
-26.762	5.454	-10.227	7.840	1836	THR	255	C
-25.614	5.176	-10.646	9.160	1837	THR	255	O
-27.147	5.363	-8.975	7.930	1838	ALA	256	N
-26.857	5.092	-6.535	7.450	1839	ALA	256	CB
-26.253	4.859	-7.901	7.310	1840	ALA	256	CA
-25.916	3.378	-8.036	7.960	1841	ALA	256	C
-26.603	2.620	-8.740	8.510	1842	ALA	256	O
-24.835	3.007	-7.323	6.650	1843	ASN	257	N
-22.337	0.672	-8.798	8.890	1844	ASN	257	ND2
-21.109	2.107	-7.549	11.730	1845	ASN	257	OD1
-22.113	1.372	-7.710	8.870	1846	ASN	257	CG
-23.147	1.291	-6.615	7.960	1847	ASN	257	CB
-24.557	1.571	-7.128	7.870	1848	ASN	257	CA
-25.629	1.113	-6.100	7.900	1849	ASN	257	C
-25.705	1.696	-4.994	7.530	1850	ASN	257	O
-26.304	0.044	-6.513	8.120	1851	LYS	258	N
-29.107	2.145	-9.971	18.410	1852	LYS	258	NZ
-29.962	2.434	-8.758	17.360	1853	LYS	258	CE
-30.116	1.109	-8.001	16.440	1854	LYS	258	CD
-28.769	0.680	-7.484	14.380	1855	LYS	258	CG
-28.702	-0.555	-6.574	11.310	1856	LYS	258	CB
-27.432	-0.250	-5.695	9.530	1857	LYS	258	CA
-27.136	-1.765	-5.044	9.690	1858	LYS	258	C
-26.632	-2.694	-5.716	11.400	1859	LYS	258	O
-27.410	-1.857	-3.772	10.650	1860	GLY	259	N
-27.304	-3.062	-2.749	1.560	1861	GLY	259	CA
-25.911	-3.457	-2.542	12.640	1862	GLY	259	C
-25.758	-4.593	-2.054	14.190	1863	GLY	259	O
-24.947	-2.579	-2.671	12.420	1864	ASP	260	N
-22.689	-3.345	-4.928	17.300	1865	ASP	260	OD2
-21.594	-1.447	-5.215	18.130	1866	ASP	260	OD1
-22.325	-2.212	-4.526	16.660	1867	ASP	260	CG
-22.707	-1.752	-3.147	14.150	1868	ASP	260	CB
-23.540	-2.777	-2.354	12.740	1869	ASP	260	CA
-23.191	-2.655	-0.885	12.470	1870	ASP	260	C
-22.134	-3.178	-0.473	13.410	1871	ASP	260	O
-23.968	-1.933	-0.130	11.130	1872	LEU	261	N
-22.218	1.106	1.016	12.140	1873	LEU	261	CD2
-24.430	2.195	1.055	10.800	1874	LEU	261	CD1
-23.720	0.895	0.712	10.720	1875	LEU	261	CG
-24.212	-0.236	1.580	10.270	1876	LEU	261	CB
-23.642	-1.641	1.279	10.530	1877	LEU	261	CA
-24.137	-2.700	2.250	10.670	1878	LEU	261	C
-25.223	-3.314	2.034	11.290	1879	LEU	261	O
-23.444	-2.875	3.345	10.110	1880	SER	262	N
-21.571	-4.254	5.054	16.550	1881	SER	262	OG
-22.760	-4.849	4.555	12.930	1882	SER	262	CB
-23.875	-3.823	4.392	10.770	1883	SER	262	CA
-24.221	-3.043	5.632	11.000	1884	SER	262	C
-23.854	-1.834	5.694	10.620	1885	SER	262	O
-24.899	-3.607	6.601	10.670	1886	ASN	263	N
-22.539	-0.946	9.981	20.380	1887	ASN	263	ND2
-24.334	-2.038	10.759	22.530	1888	ASN	263	OD1
-23.659	-1.715	9.728	19.420	1889	ASN	263	CG
-23.964	-2.284	8.416	15.830	1890	ASN	263	CB
-25.244	-2.868	7.852	12.410	1891	ASN	263	CA
-26.355	-1.844	7.534	11.510	1892	ASN	263	C
-26.466	-0.837	8.274	12.300	1893	ASN	263	O
-27.116	-2.029	6.479	10.660	1894	ILE	264	N
-26.747	1.030	4.361	12.100	1895	ILE	264	CD1
-27.116	-0.434	3.898	12.040	1896	ILE	264	CG1
-28.407	-0.920	4.587	11.870	1897	ILE	264	CB
-29.537	0.096	4.255	12.480	1898	ILE	264	CG2
-28.233	-1.140	6.128	11.270	1899	ILE	264	CA
-29.531	-1.725	6.742	11.750	1900	ILE	264	C
-29.907	-2.840	6.356	11.890	1901	ILE	264	O
-30.106	-1.011	7.690	11.090	1902	PRO	265	N
-30.380	0.401	9.502	12.200	1903	PRO	265	CG
-29.673	0.305	8.170	11.350	1904	PRO	265	CD
-31.634	-0.381	9.364	12.040	1905	PRO	265	CB
-31.373	-1.426	8.305	11.380	1906	PRO	265	CA
-32.514	-1.421	7.297	12.700	1907	PRO	265	C
-32.517	-0.535	6.444	11.960	1908	PRO	265	O
-33.454	-2.386	7.442	12.960	1909	PHE	266	N
-37.875	-3.506	5.937	15.170	1910	PHE	266	CD2
-38.786	-3.827	4.927	15.970	1911	PHE	266	CE2
-38.378	-4.693	3.883	15.890	1912	PHE	266	CZ
-37.054	-5.167	3.845	15.590	1913	PHE	266	CE1
-36.192	-4.821	4.879	15.530	1914	PHE	266	CD1
-36.584	-4.000	5.934	14.310	1915	PHE	266	CG
-35.610	-3.597	7.014	13.540	1916	PHE	266	CB
-34.625	-2.491	6.579	13.000	1917	PHE	266	CA
-35.363	-1.132	6.554	11.980	1918	PHE	266	C
-35.609	-0.547	7.618	12.950	1919	PHE	266	O
-35.708	-0.678	5.368	11.910	1920	GLY	267	N

-36.423	2.423	5.329	11.550	1921	GLY	267	CA
-35.552	1.760	4.938	11.756	1922	GLY	267	C
-36.054	2.893	4.655	12.660	1923	GLY	267	O
-34.228	1.554	4.919	10.230	1924	THR	268	N
-30.959	3.660	5.025	8.640	1925	THR	268	CG2
-32.576	3.033	6.750	8.840	1926	THR	268	OG1
-32.069	2.662	5.458	8.570	1927	THR	268	CB
-33.248	2.533	4.447	8.990	1928	THR	268	CA
-32.736	2.134	3.064	8.750	1929	THR	268	C
-32.491	0.934	2.799	8.770	1930	THR	268	O
-32.563	3.096	2.181	8.400	1931	VAL	269	N
-33.467	4.486	-0.379	10.860	1932	VAL	269	CG2
-31.106	5.145	0.379	10.960	1933	VAL	269	CG1
-32.031	4.037	-0.110	9.330	1934	VAL	269	CB
-32.036	2.825	0.844	8.820	1935	VAL	269	CA
-30.605	2.245	0.905	8.030	1936	VAL	269	C
-29.808	2.615	1.753	8.990	1937	VAL	269	O
-30.340	1.391	-0.048	8.450	1938	ASN	270	N
-27.653	-2.379	0.910	10.070	1939	ASN	270	ND2
-26.796	-1.080	-0.638	12.550	1940	ASN	270	OD1
-27.777	-1.415	0.038	10.440	1941	ASN	270	CG
-29.128	-0.763	-0.175	9.910	1942	ASN	270	CB
-29.041	0.762	-0.245	8.160	1943	ASN	270	CA
-28.528	1.291	-1.592	8.430	1944	ASN	270	C
-28.522	0.564	-2.567	9.010	1945	ASN	270	O
-28.107	2.581	-1.564	7.320	1946	LEU	271	N
-30.004	2.744	-4.787	9.420	1947	LEU	271	CD2
-31.036	4.833	-3.796	9.410	1948	LEU	271	CD1
-30.114	3.638	-3.565	8.730	1949	LEU	271	CG
-28.728	4.229	-3.267	8.210	1950	LEU	271	CB
-27.653	3.271	-2.745	7.690	1951	LEU	271	CA
-26.383	4.131	-2.427	6.670	1952	LEU	271	C
-26.432	4.890	-1.483	6.710	1953	LEU	271	O
-25.390	3.910	-3.234	6.220	1954	LEU	272	N
-20.683	2.680	-2.496	10.860	1955	LEU	272	CD2
-21.510	4.711	-1.232	10.200	1956	LEU	272	CD1
-21.605	3.918	-2.532	10.160	1957	LEU	272	CG
-23.053	3.464	-2.768	8.970	1958	LEU	272	CB
-24.080	4.581	-3.055	7.570	1959	LEU	272	CA
-23.820	5.420	-4.291	7.190	1960	LEU	272	C
-23.908	4.956	-5.412	7.000	1961	LEU	272	O
-23.523	6.705	-4.076	6.390	1962	ALA	273	N
-22.835	8.964	-4.484	7.590	1963	ALA	273	CB
-23.292	7.684	-5.132	6.710	1964	ALA	273	CA
-22.215	7.155	-6.115	6.370	1965	ALA	273	C
-21.173	6.659	-5.651	7.420	1966	ALA	273	O
-22.477	7.339	-7.390	6.410	1967	TYR	274	N
-19.670	2.713	-13.179	13.150	1968	TYR	274	OH
-22.193	4.077	-10.958	11.590	1969	TYR	274	CD2
-21.580	3.402	-12.015	11.930	1970	TYR	274	CE2
-20.205	3.344	-12.086	11.970	1971	TYR	274	CZ
-19.432	3.956	-11.126	11.190	1972	TYR	274	CE1
-20.046	4.611	-10.057	11.190	1973	TYR	274	CD1
-21.445	4.692	-9.957	9.480	1974	TYR	274	CG
-22.099	5.366	-8.793	8.540	1975	TYR	274	CB
-21.607	6.778	-8.452	7.880	1976	TYR	274	CA
-21.646	7.719	-9.661	8.310	1977	TYR	274	C
-22.755	8.118	-10.030	8.300	1978	TYR	274	O
-20.530	8.003	-10.312	7.630	1979	ASN	275	N
-16.917	9.935	-11.840	7.850	1980	ASN	275	ND2
-17.986	7.906	-12.017	9.240	1981	ASN	275	OD1
-17.990	9.118	-11.859	8.330	1982	ASN	275	CG
-19.263	9.828	-11.375	8.310	1983	ASN	275	CB
-20.540	8.971	-11.422	8.300	1984	ASN	275	CA
-20.831	8.361	-12.782	8.820	1985	ASN	275	C
-20.931	9.092	-13.759	9.540	1986	ASN	275	O
-20.873	7.043	-12.872	11.640	1987	ASN	276	N
-23.994	5.880	-12.847	19.420	1988	ASN	276	ND2
-23.483	4.524	-14.583	21.790	1989	ASN	276	OD1
-23.417	5.618	-14.012	18.820	1990	ASN	276	CG
-22.493	6.622	-14.683	15.700	1991	ASN	276	CB
-21.058	6.341	-14.163	13.390	1992	ASN	276	CA
-20.053	6.701	-15.235	13.950	1993	ASN	276	C
-20.417	6.647	-16.441	13.820	1994	ASN	276	O
-18.800	7.000	-14.924	14.550	1995	TYR	277	N
-12.941	9.919	-19.055	20.550	1996	TYR	277	OH
-14.545	7.930	-16.442	17.050	1997	TYR	277	CD2
-13.623	8.341	-17.407	17.650	1998	TYR	277	CE2
-13.841	9.526	-18.117	17.730	1999	TYR	277	CZ
-14.983	10.302	-17.860	17.740	2000	TYR	277	CE1
-15.899	9.887	-16.898	16.910	2001	TYR	277	CD1
-15.677	8.702	-16.194	16.300	2002	TYR	277	CG
-16.715	8.218	-15.203	16.130	2003	TYR	277	CB
-17.906	7.555	-15.962	15.490	2004	TYR	277	CA
-17.437	6.511	-16.959	16.260	2005	TYR	277	C
-17.028	5.481	-16.600	16.180	2006	TYR	277	O
-17.442	6.847	-18.250	18.530	2007	ALA	278	N
-18.754	5.339	-19.805	20.920	2008	ALA	278	CB
-17.118	5.861	-19.297	21.400	2009	ALA	278	CA
-15.997	6.646	-20.336	22.810	2010	ALA	278	C
-16.498	7.549	-20.786	27.370	2011	ALA	278	O
-14.280	6.494	-20.328	24.290	2012	ALA	279	N
-11.984	6.379	-21.549	23.980	2013	ALA	279	CB
-13.313	6.483	-21.572	18.720	2014	ALA	279	CA
-13.933	7.351	-23.496	23.390	2015	ALA	279	OT
-14.078	6.231	-22.837	34.990	2016	ALA	279	C
-15.111	5.484	-22.789	15.630	2017	ALA	279	O
-35.064	13.684	-0.003	6.720	2018			CA
-36.978	12.588	-1.204	9.380	2019	OW	1	O
-34.999	14.399	-2.312	12.640	2020	OW	2	O
-35.938	11.919	1.483	7.730	2021	OW	3	O
-34.450	14.471	2.224	7.780	2022	OW	4	O
-26.560	24.993	-18.082	44.710	2023	OW	5	O
-26.380	30.965	-15.935	51.570	2024	OW	6	O
-18.281	18.036	-15.172	9.510	2025	OW	7	O
-32.827	29.833	-10.293	52.300	2026	OW	8	O
-23.926	0.329	-10.727	27.690	2027	OW	9	O
-14.738	33.890	-11.779	38.520	2028	OW	10	O
-25.681	-1.352	-8.675	36.700	2029	OW	11	O
-37.432	24.577	-8.307	49.480	2030	OW	12	O
-21.042	-3.233	-6.863	5.880	2031	OW	13	O
-34.933	12.313	-4.158	27.920	2032	OW	14	O
-33.795	16.782	-3.442	13.270	2033	OW	15	O
-31.443	18.078	-3.706	9.690	2034	OW	16	O
-18.583	38.799	-1.993	35.040	2035	OW	17	O
-25.299	0.408	-2.584	11.790	2036	OW	18	O
-8.098	-3.497	-2.482	50.170	2037	OW	19	O
-7.486	5.055	-2.424	35.090	2038	OW	20	O
-11.446	9.559	0.787	9.240	2039	OW	21	O
-11.807	14.273	-0.041	6.760	2040	OW	22	O

-33.816	29.467	2.438	19.430	2041	OW	23	0
-33.688	5.819	2.995	7.420	2042	OW	24	0
-15.102	16.531	3.867	7.630	2043	OW	25	0
-20.199	39.384	5.689	14.380	2044	OW	26	0
-18.116	27.574	4.937	11.690	2045	OW	27	0
-7.657	37.029	4.138	58.440	2046	OW	28	0
-21.159	22.544	5.159	8.350	2047	OW	29	0
-39.011	13.244	7.181	27.690	2048	OW	30	0
-4.765	9.357	10.416	31.270	2049	OW	31	0
-28.755	17.609	9.000	12.470	2050	OW	32	0
-5.081	12.826	9.678	11.370	2051	OW	33	0
-18.425	0.987	9.404	17.300	2052	OW	34	0
-39.706	14.110	11.213	19.540	2053	OW	35	0
-19.864	14.862	10.576	19.700	2054	OW	36	0
-34.534	3.370	15.216	41.260	2055	OW	37	0
-30.053	-0.414	13.578	27.790	2056	OW	38	0
-36.792	25.332	16.081	36.740	2057	OW	39	0
0.483	-1.772	-19.853	21.540	2058	OW	41	0
-9.390	8.747	-18.787	35.640	2059	OW	42	0
-6.597	14.147	-18.970	27.340	2060	OW	43	0
-5.923	7.770	-18.152	42.320	2061	OW	44	0
-1.268	19.902	-14.127	39.510	2062	OW	45	0
-32.390	14.459	-14.261	24.710	2063	OW	46	0
-6.167	14.131	-12.739	30.170	2064	OW	47	0
-24.383	9.276	-12.097	10.250	2065	OW	48	0
-29.200	25.706	-10.193	12.000	2066	OW	49	0
-19.882	35.300	-10.204	38.410	2067	OW	50	0
-17.343	12.586	-10.602	12.320	2068	OW	51	0
-1.908	3.485	-10.784	46.600	2069	OW	52	0
-14.747	-6.769	-8.800	33.720	2070	OW	53	0
-25.091	8.079	-8.326	9.830	2071	OW	54	0
-35.643	22.867	-7.415	25.160	2072	OW	55	0
-34.908	9.757	-5.532	44.160	2073	OW	56	0
-32.151	17.583	-6.364	10.670	2074	OW	57	0
-20.074	4.226	-5.802	12.130	2075	OW	58	0
-32.241	37.824	-5.192	11.200	2076	OW	59	0
-13.228	1.737	-5.065	12.250	2077	OW	60	0
-3.427	11.617	-5.896	20.580	2078	OW	61	0
-34.254	6.256	-4.932	33.880	2079	OW	62	0
-38.649	21.544	-4.260	23.160	2080	OW	63	0
-25.503	14.132	-3.087	16.780	2081	OW	64	0
-9.245	30.450	-3.596	18.780	2082	OW	65	0
-27.780	-7.362	-4.000	55.580	2083	OW	66	0
-33.407	7.797	-2.979	13.400	2084	OW	67	0
-12.334	3.025	-2.688	14.520	2085	OW	68	0
-38.464	22.374	-1.685	13.490	2086	OW	69	0
-12.509	11.573	-0.729	8.130	2087	OW	70	0
-12.290	34.973	0.356	16.190	2088	OW	71	0
-18.233	3.025	0.672	9.640	2089	OW	72	0
-7.284	7.282	1.087	28.590	2090	OW	73	0
-9.369	9.348	2.506	14.220	2091	OW	74	0
-20.475	20.553	3.220	7.380	2092	OW	75	0
-8.125	3.620	2.919	37.460	2093	OW	76	0
-8.018	32.360	3.298	26.030	2094	OW	77	0
-3.577	28.821	3.359	20.060	2095	OW	78	0
-39.678	9.187	4.999	31.890	2096	OW	79	0
-40.308	19.090	6.966	23.950	2097	OW	80	0
-7.734	29.806	7.972	25.880	2098	OW	81	0
-36.494	8.712	8.616	23.770	2099	OW	82	0
-34.480	1.948	8.255	19.930	2100	OW	83	0
-8.393	8.347	7.465	30.770	2101	OW	84	0
-7.087	-2.902	9.078	49.610	2102	OW	85	0
-37.537	5.724	9.050	14.580	2103	OW	86	0
-24.325	-6.148	8.706	34.880	2104	OW	87	0
-12.862	1.307	7.719	40.950	2105	OW	88	0
-16.123	1.463	9.936	28.440	2106	OW	89	0
-1.433	17.945	9.383	24.060	2107	OW	90	0
-6.089	11.567	11.758	18.330	2108	OW	91	0
-13.261	33.005	12.540	17.900	2109	OW	92	0
-24.498	14.585	14.546	29.180	2110	OW	93	0
-28.783	1.633	14.917	41.090	2111	OW	94	0
-16.402	32.605	15.362	23.750	2112	OW	95	0
-5.753	27.580	15.120	33.640	2113	OW	96	0
-8.050	29.269	15.322	35.250	2114	OW	97	0
-33.906	9.316	16.112	22.380	2115	OW	98	0
-32.532	30.219	17.182	31.100	2116	OW	99	0
-22.391	4.721	17.541	51.580	2117	OW	100	0
-38.119	15.041	17.399	10.510	2118	OW	101	0
-15.182	28.726	23.213	47.510	2119	OW	102	0
-7.472	14.542	25.118	38.240	2120	OW	103	0
-34.457	15.405	-6.561	20.040	2121	OW	104	0
-37.694	29.140	8.217	14.080	2122	OW	105	0
-17.232	4.193	10.280	11.310	2123	OW	106	0
-28.676	39.171	-2.026	22.490	2124	OW	107	0
-12.976	1.181	-1.208	18.120	2125	OW	108	0
-9.646	17.145	13.838	22.380	2126	OW	109	0
-6.481	12.107	21.824	23.230	2127	OW	110	0
-4.257	4.531	-8.602	19.680	2128	OW	111	0
-7.250	38.121	-12.377	52.990	2129	OW	112	0
-10.800	6.428	9.305	25.040	2130	OW	113	0
-13.579	12.547	-20.723	35.340	2131	OW	114	0
-21.175	20.508	11.520	27.430	2132	OW	115	0
-12.040	3.405	-9.083	44.820	2133	OW	116	0
6.281	-7.913	-30.136	25.310	2134	OW	117	0
-7.136	22.394	14.115	22.230	2135	OW	118	0
1.916	33.846	29.370	25.670	2136	OW	119	0
-37.420	4.306	-10.819	31.800	2137	OW	120	0
1.459	22.395	-21.815	22.740	2138	OW	121	0
-16.306	-5.129	1.718	37.430	2139	OW	122	0
-23.717	-0.055	23.277	26.720	2140	OW	123	0
-3.294	18.792	30.139	31.210	2141	OW	124	0
-17.888	28.552	-12.654	43.370	2142	OW	125	0
-39.320	5.502	-8.968	33.870	2143	OW	126	0
-9.119	2.438	-2.163	39.350	2144	OW	127	0
-36.423	15.123	27.902	23.870	2145	OW	128	0
-27.728	-8.369	11.223	31.270	2146	OW	129	0
-18.021	34.492	-15.216	25.900	2147	OW	130	0
5.323	-4.274	17.640	45.350	2148	OW	131	0
5.179	-7.366	-22.875	24.370	2149	OW	132	0
-36.131	19.460	-6.009	35.480	2150	OW	133	0
-24.295	9.695	-14.877	22.290	2151	OW	134	0
-13.281	4.965	-26.136	38.130	2152	OW	135	0
-11.356	32.056	-18.930	22.400	2153	OW	136	0
-4.617	39.227	6.275	32.840	2154	OW	137	0
-35.716	21.609	-13.633	57.160	2155	OW	138	0
-30.036	23.890	-12.519	26.810	2156	OW	139	0
-38.862	1.454	-10.576	51.710	2157	OW	140	0
-13.240	-5.881	7.148	28.360	2158	OW	141	0
-13.348	-6.423	10.785	28.830	2159	OW	142	0
-6.773	14.062	18.250	35.560	2160	OW	143	0

-20.685	37.412	16.226	43.100	2161	OW	144	0
1.032	0.180	16.063	26.300	2162	OW	145	0
-9.706	37.033	17.872	34.310	2163	OW	146	0
-29.162	13.001	-25.834	29.280	2164	OW	147	0
-29.697	7.000	-22.881	27.910	2165	OW	148	0
5.324	-8.363	-20.340	39.800	2166	OW	149	0
-13.287	-6.570	-7.307	30.830	2167	OW	150	0
-12.934	35.030	-12.797	25.270	2168	OW	151	0
-24.785	21.735	-19.340	34.170	2169	OW	152	0
-0.387	18.637	4.830	34.740	2170	OW	153	0
-6.771	8.861	5.363	34.790	2171	OW	154	0
-6.962	11.818	19.206	25.510	2172	OW	155	0
-29.777	26.611	17.835	30.300	2173	OW	156	0
-26.167	0.776	19.980	28.770	2174	OW	157	0
-28.493	0.467	23.358	24.490	2175	OW	158	0
-8.716	17.824	-13.484	30.180	2176	OW	159	0
-18.856	32.267	-10.663	40.110	2177	OW	160	0
-27.876	8.187	-20.970	27.750	2178	OW	161	0
-28.129	23.144	-14.223	32.430	2179	OW	162	0
-30.946	-1.050	15.859	37.630	2180	OW	163	0
-9.602	32.628	-4.113	33.250	2181	OW	164	0
-3.405	5.886	-20.759	26.280	2182	OW	165	0
0.981	18.867	8.990	27.620	2183	OW	166	0
3.276	24.469	-20.204	29.200	2184	OW	167	0
-30.184	14.411	-28.991	17.320	2185	OW	168	0
-9.051	7.771	-21.881	41.890	2186	OW	169	0
-19.679	-4.061	-4.999	25.970	2187	OW	170	0
-19.845	18.609	15.228	38.810	2188	OW	171	0
-17.611	16.233	11.448	30.790	2189	OW	172	0
-34.007	34.448	0.348	24.510	2190	OW	173	0
-19.341	10.650	-15.486	19.680	2191	OW	174	0
-13.570	16.550	-11.150	26.567	2192	OW	175	0
-42.060	11.540	-10.240	32.345	2193	OW	176	0

L E B E N S L A U F

24.12.1956	geboren in Bochum (Nordrhein-Westfalen)
Apr. 1963 - Juli 1965	Grundschule in Bochum
Juli 1965	Umzug von Bochum nach Stadthagen (Niedersachsen)
November 1967	Grundschulabschluß in Stadthagen
Dez. 1967 - Apr. 1975	Ratsgymnasium in Stadthagen
April 1975	Abitur
September 1975	Beginn des Physikstudiums an der Georg August Universität in Göttingen
April 1978	Diplomvorprüfung
Jan. 1982 - Aug. 1982	Diplomarbeit bei Prof. Dr. W. Saenger / Prof. Dr. W. Schröter, angefertigt am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen Thema: Untersuchung über die Struktur des linearen Polyjodids als Einschlußverbindung im ß-Cyclodextrin und Neutronenstrukturverfeinerung des ß-Cyclodextrin Dodecahydrats
November 1982	Diplomhauptprüfung
seit 1983	Anfertigung meiner Dissertation bei Prof. Dr. W. Saenger am Institut für Kristallographie der Freien Universität Berlin.